

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNE KAROLINE SCHREIBER

VIA INDOLAMINA 2,3-DIOXIGENASE/ QUINURENINA COMO POTENCIAL
ALVO FARMACOLÓGICO NO TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA
ASSOCIADA AO DIABETES

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNE KAROLINE SCHREIBER

VIA INDOLAMINA 2,3-DIOXIGENASE/ QUINURENINA COMO POTENCIAL
ALVO FARMACOLÓGICO NO TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA
ASSOCIADA AO DIABETES

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Doutora em
Farmacologia, Programa de Pós Graduação
em Farmacologia, setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Joice Maria da
Cunha

CURITIBA

2016

Schreiber, Anne Karoline

Via Indolamina 2,3-dioxigenase/quinurenina como potencial alvo farmacológico no tratamento da dor neuropática associada ao diabetes / Anne Karoline Schreiber – Curitiba, 2016.

100 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Joice Maria da Cunha

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Dor neuropática.
2. *Diabetes mellitus*.
3. Serotonina.
4. Indolamina-Pirrol 2,3,-dioxigenase.
5. Quinureninas. I. Cunha, Joice Maria da. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.0472

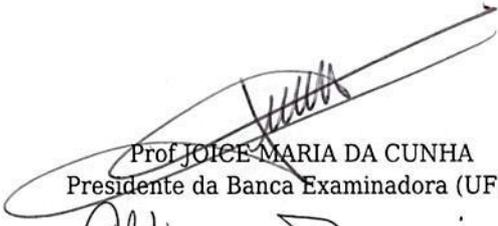


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

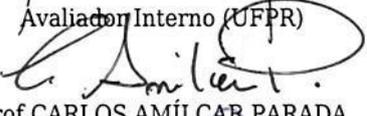
TERMO DE APROVAÇÃO

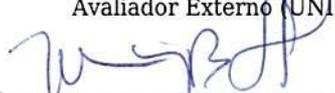
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de ANNE KAROLINE SCHREIBER, intitulada: "**VIA INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE/QUINURENINA COMO POTENCIAL ALVO FARMACOLÓGICO NO TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADA AO DIABETES**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

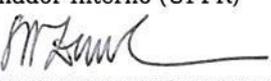
Curitiba, 05 de Agosto de 2016.


Prof JOICE MARIA DA CUNHA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


Prof ALEKSANDER ROBERTO ZAMPONIO
Avaliador Interno (UFPR)


Prof CARLOS AMÍLCAR PARADA
Avaliador Externo (UNICAMP)


Prof MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Avaliador Interno (UFPR)


Prof SILVIO MARQUES ZANATA
Avaliador Externo (UFPR)

Para Milu e Toquinho, vocês são a saudade que eu gosto de ter...

Para os poucos, que foram muito!

“É preciso amar as pessoas
Como se não houvesse amanhã
Porque se você parar pra pensar
Na verdade não há...”

(Legião Urbana, Pais e Filhos)

AGRADECIMENTOS

Agradecer é definitivamente a melhor parte, mas também a mais difícil. Quando começo a pensar no que sou e o que me trouxe até aqui, é impossível chegar a um momento pontual que mudou tudo. Foi um processo que começou há muito, muito tempo. Foram dez anos de Universidade, em que muitos sonhos deixaram de sê-los para tornarem-se realidade. Muitos outros também foram construídos neste tempo, algumas verdades se perderam e só posso afirmar definitivamente que tudo o que fiz foi com muito, muito amor.

Mas se eu parar para pensar, o que sou hoje começou antes, lá no ensino fundamental, que despertou a inquietação do “porquê?”, deixando a vontade de entender como as pessoas conseguiam descobrir coisas tão, mas tão grandiosas. Porque a descoberta também é um processo, e às vezes a gente não se dá conta disso. Mas na verdade, a minha construção começou ainda antes, lá com a professorinha do “prezinho”, a quem coube a mais difícil missão de domar 2 dezenas e meia de criancinhas doidas pelo recreio, ensinando o respeito ao próximo e a nos relacionarmos.

Mas falando a verdade, o que eu sou hoje começou ainda antes, quando meus pais descobriram que teriam mais uma pessoinha entre eles, a quem deveriam zelar pelo bem estar físico, mental e atender às vontades de um ser humano em desenvolvimento. Nem que para isso tivessem que abrir mão de coisas para si, enfrentar adversidades e brigar pelo que achassem justo para este serzinho. E isso tudo acontece até hoje, muitos e muitos anos depois. À quem já era, e à quem se tornou minha família, meu maior agradecimento.

E em um momento de profunda tristeza, em que é difícil até respirar, pensar que há tempo contado para tudo... Pois não sei quanto ainda nos será concedido com sua presença, Pai. Somente em Deus e em minha família posso encontrar forças para prosseguir...E mesmo que você não veja estas linhas, eu deixo aqui o meu agradecimento de todo o meu coração pelos anos que pudemos estar juntos. E peço perdão pelos meus erros, pelas minhas faltas, pelo meu comportamento às vezes teimoso e duro...Pai, te amo.

Como posso finalmente constatar, ainda estou em construção e desconstrução, pois a vida é esse processo lindo, graças à Deus... sendo Ele o maior “culpado” de tudo. Pela vida, pela saúde, pela minha família, por todas as dificuldades e todas as coisas maravilhosas que aconteceram no meu caminho e que hoje fazem parte de mim. Pois mesmo quando toda a vontade era de não continuar, Ele continuou me ouvindo baixinho, e hoje estou aqui, plena, para agradecer. “...vem, deposita em minhas mãos todos os teus problemas, levanta este olhar... não chore, não tema, não perca esta fé que você tem em Mim...”

Hoje também gostaria de agradecer às pessoas que inspiram. Àquelas que fazem o seu melhor, nas quais a gente se espelha, naquelas que tentamos imitar... São as pessoas que entram nas nossas vidas para nos tornar melhores, mesmo sem que saibam desta influência, de como nos cativam. Neste imenso grupo está quem faz “com e por amor”. Eu sinto, eu vejo quando isso acontece. Sendo assim, também é preciso agradecer àqueles que fazem exatamente o contrário, mostrando a mim tudo o que eu não queria ser, sendo o exemplo que eu não queria seguir. Isso também ajudou a construir meu caráter.

Aos meus poucos, porém preciosos amigos: Carina; Carlos; Day; Erika; Helen; Jonas (Nirut!!); Letícia (deesde a graduação!); Marília (Bioquímica UFPR); Meire (Genética UFPR) e aos outros muitos amigos de departamento que cultivei ao longo destes anos. Espero poder tê-los inspirado!

À minha orientadora Prof^a Dr^a Joice Maria da Cunha, cuja carreira dentro da Universidade acompanhei quase desde o começo. De quem sou testemunha do esforço para fazer o melhor dentro de todas as nossas possibilidades. Espero também ter sido digna de tal esforço.

Aos diversos estudantes de iniciação científica, grupo do qual fiz parte e de onde vi muita gente boa e capaz sair (ou ficar). Isso inclui também os alunos que não estavam diretamente abaixo de minha asa, mas que de alguma forma também tentei ajudar. É gratificante pensar que ajudei de alguma forma na construção de vocês.

“...E àqueles que eu fiz sofrer, peço perdão...” Sinto a grande necessidade de pedir perdão por todos os experimentos, por todos os testes e por toda a dor

que forçamos nossos animais a passar. Mesmo fazendo o possível para tratá-los de forma digna, sei que a vida de nossos animais é sim um preço caro demais a ser pago para tudo o que fazemos.

Aos professores do departamento de Farmacologia da UFPR, muitos dos quais tive o privilégio de conhecer um pouco melhor, de ser aluna, de aprender mais. Obrigada.

Às funcionárias da Farmaco, Silvinha (que desde sempre ajudou, desde a época de pesagem de drogas na balança “proibida”, cálculos e conversas de corredor) e Nair (que também desde sempre está nos dando uma mãozinha tão necessária) e Patrícia, as quais conheço desde o mestrado, e que ajudaram para a construção desta tese. Aos técnicos do Biotério da UFPR, que desde o tempo da graduação vêm ajudando os alunos que dependem de animais experimentais. Nosso trabalho é totalmente dependente do trabalho de vocês. Aos técnicos da FMRP, Serginho (ah Tião, você que brilha!), Ieda, Giu (que com carinho quase maternal me atendeu nas i-nú-me-ras vezes que precisei) e Dona Eleni (à paciência e disposição para fazer os cortes de lâminas em prazos super apertados). Todos vocês merecem não só o meu agradecimento, mas o de muitos e muitos alunos.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

Ao departamento de Farmacologia, e à UFPR, pela oportunidade.

RESUMO

O diabetes é uma doença crônica, debilitante e de alta prevalência, cuja gravidade aumenta com o aparecimento de complicações subjacentes. Dentre estas, a dor neuropática diabética (DND) parece estar associada à morbidade e mortalidade no diabetes, dada a dificuldade de tratamento. A fisiopatologia da DND tem sido associada à redução do tônus imposto pelo sistema descendente inibitório, incluindo aqueles dependentes da liberação de serotonina (5-HT). Neste contexto, nossa hipótese é de que a via indolamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1)/quinureninas (KYN) possa estar envolvida no mecanismo patológico da DND, uma vez que a mesma é a principal via de catabolismo do triptofano, levando à depleção de serotonina e à produção de quinureninas neurotóxicas. Assim, nosso objetivo foi investigar o papel da via IDO1/KYN na alodinia mecânica em animais com diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina (STZ). Verificamos que a alodinia mecânica inicia-se 2 semanas após a indução do diabetes, com pico na 4ª semana, havendo redução de cerca de 20% no limiar mecânico dos animais diabéticos (Dbt) quando comparados aos animais normoglicêmicos (Ngl). Corroborando a nossa hipótese, foi observado que 1) animais Dbt apresentam significativa redução dos níveis de 5-HT no cordão espinhal (CE), com baixa reposição deste neurotransmissor (evidenciada pelo aumento da razão 5-HT1AA/5-HT) nesta estrutura e 2) o tratamento com fluoxetina (bloqueador da recaptação da serotonina) induziu efeito antinociceptivo nestes animais. Apesar da expressão de IDO1, enzima passo-limitante da via, não estar alterada em CE de animais Dbt quando comparada aos animais Ngl, o tratamento com 1-L-metil triptofano (antagonista da IDO1) promoveu antinocicepção em animais Dbt. A ausência de alteração na expressão da IDO no CE de animais Dbt pode estar associada à não observação de alterações significativas nos níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α) nem nos marcadores para astrócitos (GFAP) e micróglia (IBA-1) no CE destes animais. Curiosamente, os níveis de IL-1 β e TNF α em nervo ciático de animais Dbt apresentam-se reduzidos quando comparados aos níveis observados em animais Ngl. Da mesma forma, a enzima quinurenina 3 monoxigenase (KMO), também importante na geração de KYN, não se demonstrou aumentada em animais Dbt em relação ao grupo Ngl, embora seu bloqueio farmacológico pelo tratamento com JM-6 tenha induzido significativo efeito antinociceptivo nestes animais. Por fim, dada a ativação de receptores NMDA por algumas KYN, verificamos que a administração intratecal de um antagonista NMDA o MK-801 também aumentou significativamente o limiar mecânico em animais Dbt. Assim, podemos concluir que a ativação da via IDO1/KYN parece estar associada ao desenvolvimento da DNP, levando tanto a redução de 5-HT e, portanto, da ativação das vias descendentes inibitórias quanto ao aumento da produção de KYN, as quais possivelmente devido à ligação aos receptores NMDA aumentam o tônus das vias descendentes facilitatórias.

Palavras-chave: Dor neuropática, diabetes, serotonina, IDO1, quinureninas.

ABSTRACT

Diabetes is a highly disabling chronic disease, prevalent in both low and high income countries. Among the complications, the diabetic neuropathic pain (DNP) is cited as one of the main and more difficult to treat complication and is highly linked to higher mortality and morbidity in diabetic patients. The pathophysiology of DNP has been associated with a reduction of endogenous inhibitory descending pathway tonus, including the fat ones driven by neurotransmitters as serotonin. In this context, our hypothesis is that the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)/kynurenine (KYN) pathway might be related to the pathological process of DNP, since this pathway is mainly related to the L-tryptophan catabolism, lowering serotonin levels and also producing neuroactive kynurenines. Then, we investigated the role of IDO1/KYN in the generation of mechanical allodynia in streptozotocin (STZ)-diabetic animals (Dbt) in which the mechanical allodynia was initiated 2 weeks after the STZ injection, peaking in the fourth week. Corroborating our hypothesis, we observed that Dbt rats have reduced spinal cord serotonin levels, and lower 5-HT turnover evidenced by an increase of the 5-HIAA/5HT ratio and that the mechanical allodynia in Dbt rats is significantly prevented by SSRI fluoxetine. Although the rate limiting enzyme IDO1 expression was not altered in the spinal cord from Dbt rats, the pharmacological blockade of IDO1 by 1-L-MT evoked a significant reduction in the mechanical allodynia in these animals. Pro inflammatory cytokine levels (IL-1 β , IL-6 e TNF α) in the spinal cord did not differ between normoglycemic (Ngl) and Dbt rats while in sciatic nerve, we observed a reduction of IL-1 β and TNF- α levels, revealing a lower pro inflammatory tonus in these tissues, which might explain the absence of statistical difference of IDO1 expression in the spinal cord. Given the presence of IDO1/KYN in glial cells and its importance for the neuropathic pain states, we observed no effect of diabetes on the expression of IBA-1 (microglial marker) and GFAP (astrocytic marker) production between Ngl and Dbt animals. In addition, immunofluorescence revealed morphological changes in astrocytic cells in the spinal cord of Dbt animals 3 and 4 weeks after the STZ injection, prompting to idea that these cells might have an alteration in its metabolism or function. The kynurenine 3-monooxygenase (KMO) enzyme, another important enzyme for the kynurenine generation, remained unchanged in Dbt rats after 4 weeks when compared to Ngl group, despite its blockade induced antinociception by JM-6 in these animals. Since NMDA receptors might be activated by quinurenins, as these receptors are upregulated in the DPN, we further demonstrated that the pharmacological blockade of these receptors also promoted reduction in the mechanical allodynia in Dbt group. All together, our data suggest that the physiopathology of DNP may involve the overactivation of IDO1/KYN pathway, which explained the decrease of serotonin levels/ turnover and the pharmacological effectiveness of compounds that interfere directly or indirectly in this pathway over the mechanical allodynia in DBT animals. Further studies however are needed to characterize the importance of this pathway activation not only in DNP but also in other neuropathic pain conditions.

Keywords: diabetes; streptozotocin; serotonin; cytokines.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Teorias das diferentes formas de modulação descendente do eixo PAG-RVM-DH.....	25
FIGURA 2 - Via IDO1/KYN de metabolismo do aminoácido triptofano (Trp) e formação das quinureninas (Kyn).....	31
FIGURA 5.1 – Determinação de estado hiperglicêmico em animais após a administração de STZ.....	41
FIGURA 5.2 - Alterações sensoriais quanto ao estímulo mecânico em animais diabéticos (Dbt) em relação aos normoglicêmicos (Ngl).....	42
FIGURA 5.3 – Mudança nos níveis de serotonina e do <i>turnover</i> (5-HIAA/5HT) em porção lombar de medula espinal de animais Ngl e Dbt após 4 semanas.....	43
FIGURA 5.4 – Efeito do tratamento sub crônico com inibidor de recaptção de serotonina (fluoxetina) sobre a alodinia mecânica em animais Dbt.....	45
FIGURA 5.5 - Expressão relativa de IDO (indolamina 2,3-dioxigenase) em porção lombar de medula de animais Ngl e Dbt	46
FIGURA 5.6 - Imunofluorescência para a enzima IDO1 (indolamina 2,3-dioxigenase) em porção lombar, corno dorsal da medula de animal representativo do grupo Ngl e Dbt 3 e 4 semanas.....	47
FIGURA 5.7 - Atividade antinociceptiva promovida pelo bloqueio da enzima IDO com o bloqueador 1-MT em animais Dbt 3 semanas.....	49
FIGURA 5.8 - Atividade antinociceptiva promovida pelo bloqueio da enzima IDO com o bloqueador 1-MT em animais Dbt 4 semanas.....	50
FIGURA 5.9 - Dosagem de diferentes citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) no nervo ciático e cordão espinal de animais Ngl e Dbt.....	52
FIGURA 5.10 - Expressão de marcador para microglial, IBA-1 em porção lombar de medula de animais Ngl e Dbt.....	53

FIGURA 5.11 - Expressão relativa de GFAP em porção lombar de medula nos grupos Ngl e Dbt.....	54
FIGURA 5.12 - Distribuição de marcador para astrócitos (GFAP) em porção lombar de medula de animais Ngl e Dbt.....	55
FIGURA 5.13 - Expressão da enzima KMO em porção lombar de medula de animais Ngl e Dbt.....	56
FIGURA 5.14 - Efeito do tratamento agudo com JM-6 sobre a hipersensibilidade mecânica de animais Dbt 4 semanas pós diabetização.....	57
FIGURA 5.15 - Efeito do tratamento agudo e intratecal com MK-801 sobre a hipersensibilidade mecânica de animais Dbt 4 semanas pós diabetização.....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Critérios diagnósticos utilizados para determinação de quadro diabético e de hiperglicemia intermediária.....	16
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Dbt – Diabético

DH – *Dorsal Horn* (corno dorsal da medula)

DND – Dor Neuropática Diabética

DM – Diabetes *mellitus*

FDA – *US Food and Drug Administration*

GABA - Ácido γ -aminobutírico

IDO1 – Indolamina 2,3-dioxigenase 1

IDO2 – Indolamina 2,3-dioxigenase 2

JM-6 – 3,4-dimetoxi-N-(4-(3-nitrofenil)-5-(piperidina-1-metil)tiazol-2-il)benzenesulfonamida

KAT – Quinurenina amino transferase

KMO – Quinurenina monooxigenase

Kyn - Quinurenina

L-Trp – L- triptofano

MK-801 – (5S,10R)-(+)-5-Metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imino maleato

MOP – Receptores μ opioides

Ngl – Normoglicêmico

NMDA – receptor N-metil-D-aspartato

PAG – *Periaqueductal grey matter* (substância cinzenta periaqueductal)

RVM – *Rostral ventromedial medula* (bulbo rostroventromedial)

TDO – Triptofano 2,3-dioxigenase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Diabetes <i>mellitus</i>	16
1.2 Neuropatia Diabética.....	18
1.3 Dor Neuropática Diabética (DND).....	19
1.4 Tratamento da DND.....	20
1.5 Sistema Inibitório Descendente.....	22
1.6 Alterações na via Descendente e Serotonérgica no Diabetes.....	26
1.7 Via indolamina 2,3 Dioxigenase (IDO).....	28
1.8 Via das Quinureninas.....	30
1.9 Via das Quinureninas e Processos Patológicos.....	30
2 HIPÓTESE	32
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Drogas, Soluções e Grupos experimentais.	33
4.2 Animais.....	34
4.3 Indução ao diabetes experimental.....	35
4.4 Medida da Hipersensibilidade Mecânica (Von Frey Eletrônico)	35
4.5 Coleta de Tecidos.....	36
4.6 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	36

4.7 Análises de Western Blotting.....	37
4.8 Quantificação de citocinas pelo método de ELISA.....	38
4.9 Imunofluorescência.....	39
4.10 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Determinação de estado hiperglicêmico em animais após a administração de STZ.....	40
5.2 Decurso temporal do limiar mecânico de animais Ngl e Dbt.....	41
5.3 Animais Dbt apresentam níveis reduzidos de serotonina e maior degradação desta monoamina em porção lombar de medula espinal.....	43
5.4 Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina sobre a hipersensibilidade mecânica.....	44
5.5 Expressão da enzima IDO1 (indolamina 2,3-dioxigenase) em porção lombar de medula espinal de animais Ngl e Dbt.....	45
5.6 Imunofluorescência para a enzima IDO1 (indolamina 2,3-dioxigenase) em porção lombar de medula em animais normoglicêmicos e diabéticos.....	46
5.7 Efeito do tratamento agudo com inibidor da IDO, 1-L-metil triptofano sobre a alodinia mecânica em animais diabéticos.....	48
5.8 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias (Il-1 β , Il-6 e TNF- α) em tecido nervoso central e periférico de animais Dbt e Ngl.....	51
5.9 Expressão de proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (IBA-1) na porção lombar do cordão espinal de animais normoglicêmicos e diabéticos.....	52
5.10 Expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em porção lombar de cordão espinal de animais normoglicêmicos e diabéticos.....	53

5.11 Análise da distribuição de GFAP em porção lombar de cordão espinhal de animais normoglicêmicos (Ngl) ou diabéticos (Dbt) através de imunofluorescência.....	54
5.12 Expressão da enzima quiniurenina 3-monooxigenase (KMO) em porção lombar do cordão espinhal de animais normoglicêmicos e/ ou diabéticos.....	55
5.13 Efeito do tratamento agudo com inibidor da KMO, JM-6 sobre a alodinia mecânica em animais diabéticos.....	56
5.14 Efeito do tratamento intratecal com o antagonista de receptores NMDA, MK-801 sobre a alodinia mecânica em animais diabéticos.....	58
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	77
8 REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

2

1.1 Diabetes *mellitus*

3
4 Caracterizado como um conjunto de desordens metabólicas cujo estado
5 hiperglicêmico é subjacente (KLEINBERGER; POLLIN, 2015), o diabetes pode ser
6 causado por diferentes etiologias que resultem na ausência de produção e/ou da
7 atividade do hormônio peptídico insulina (ALBERTI; ZIMMET, 1998). Tais alterações
8 metabólicas determinam a classificação das formas de diabetes *mellitus* (DM), a
9 saber: DM tipo I, DM tipo II e o gestacional (IDF ATLAS, 2015). Ademais, a suspeita
10 de diabetes é confirmada quando a glicose sérica (jejum) é igual ou superior a 126
11 mg/dL, ou se a glicemia após sobrecarga oral varia acima de 200 mg/dL, tais
12 situações ocorrendo ao menos em dois eventos distintos. Outras condições além do
13 diabetes, como a tolerância reduzida à glicose ou a glicemia de jejum alterada
14 possuem critérios diagnósticos diferenciados, conforme a tabela 1. Estas condições
15 de “pré-diabetes” são estados cuja tendência ao desenvolvimento de diabetes é
16 maior (IDF ATLAS, 2015).

Condição X Critério diagnóstico	Glicemia de jejum		Glicemia após 2 h de sobrecarga oral de glicose
Diabetes	≥ 126 mg/ dL	✓	≥ 200 mg/ dL
Tolerância reduzida à glicose	≤ 126 mg/ dL	+	$140 \geq e \leq 200$ mg /dL
Glicemia de jejum alterada	$110 \geq e \leq 125$ mg/ dL	+	≤ 140 mg /dL

17 Tabela 1: Critérios diagnósticos utilizados para determinação de quadro diabético e de
18 hiperglicemia intermediária. O símbolo “+” determina que para o diagnóstico são necessários ambos
19 os critérios, ao passo que o símbolo “/” determina que para o diagnóstico do quadro é necessária a
20 presença de apenas um dos sinais apresentados. Fonte: IDF Atlas, 2015.

21

22 Resumidamente, o DM I é a condição resultante da destruição das células β
23 pancreáticas, levando à deficiência na produção de insulina e à necessidade de
24 reposição deste hormônio. Acredita-se que na maioria dos casos o sistema imune
25 (forma autoimune) seja o responsável pelo reconhecimento de antígenos produzidos
26 pelas células β pancreáticas como não próprias (IDF ATLAS, 2015), embora possa
27 não haver marcadores de tal reconhecimento (forma idiopática) (IDF ATLAS, 2015),
28 embora possa não haver marcadores de tal reconhecimento (forma idiopática)

1 (DIRETRIZES SBD, 2015). O DM II, a forma mais comum do DM (85-95% dos
2 pacientes), é caracterizado pela combinação entre deficiência na secreção e/ou
3 ação da insulina em diferentes graus, de modo que os pacientes podem permanecer
4 não diagnosticados durante muitos anos. O tratamento com insulina não é essencial,
5 mas pode ser necessário para o bom controle metabólico, associado a mudanças
6 nos hábitos alimentares e de vida. Ainda não foi estabelecido o mecanismo que
7 desencadeia esta forma da síndrome, embora se conheçam alguns genes para a
8 susceptibilidade, além de se saber que hábitos sedentários possuem participação na
9 etiologia da doença (KLEINBERGER; POLLIN, 2015). Por fim, o diabetes
10 gestacional remete a qualquer grau de intolerância à glicose, descoberta ou iniciada
11 durante o período de gestação (IDF ATLAS, 2015). Afeta entre 1 e 14% das
12 gestações e está relacionado à morbidade e mortalidade perinatais (LAWRENCE et
13 al., 2008), além do risco aumentado de desenvolvimento de hipertensão durante o
14 período e macrosomia (tamanho do feto maior que a média), tornando mais difícil o
15 parto normal (IDF ATLAS, 2015).

16 Considerado como epidemia mundial, o diabetes acomete cerca de 415
17 milhões de pessoas, havendo a estimativa de que tal número alcance mais de 600
18 milhões até o ano de 2040 (IDF ATLAS, 2015). Em nosso país, estima-se que haja
19 mais de 13 milhões de pacientes diabéticos, o que torna o Brasil o quarto colocado
20 dentre os países com maior número destes pacientes (DIRETRIZES SBD, 2015).
21 Ademais, há em torno de 320 milhões de indivíduos com tolerância reduzida à
22 glicose no mundo, o que pode levar ao desenvolvimento futuro do diabetes (IDF
23 ATLAS, 2015).

24 O diabetes é ainda considerada uma síndrome de alto impacto econômico,
25 visto que o consumo de recursos financeiros dos sistemas de saúde é de 2 a 3
26 vezes maior para diabéticos do que pessoas sem esta patologia. Acredita-se que
27 12% das despesas mundiais com saúde sejam dedicadas ao diabetes, e em
28 especial, às complicações associadas, sejam elas micro ou macrovasculares
29 (KLEINBERGER; POLLIN, 2015; ALBERTI; ZIMMET, 1998; VINIK et al., 1992) como
30 doença cerebrovascular, retinopatia, nefropatia, doenças do sistema cardiovascular
31 e neuropatia. Tais complicações são as principais causadoras de mortalidade e
32 morbidade neste grupo de pacientes (IDF ATLAS, 2015; KLEINBERGER; POLLIN,
33 2015) e podem ocorrer devido à maior permeabilidade de determinados tecidos à
34 glicose circulante, tornando-os proporcionalmente mais afetados pela hiperglicemia,
35 seja ela ocasional ou persistente (GABBAY, 1973).

1.2 Neuropatia Diabética

A neuropatia diabética é uma das complicações mais frequentes associadas ao diabetes (TESFAYE et al., 2013a), acometendo cerca de metade dos pacientes diabéticos em algum momento da progressão da doença (SHEETZ; KING, 2002). É caracterizada pela “presença de sinais e/ou sintomas de disfunção de nervo periférico, após exclusão de outras causas” (BOULTON et al., 1998). Parece ser a complicação do diabetes com maior grau de morbidade e mortalidade, e com grande impacto econômico (VINIK; MEHRABYAN 2004; HOLZER et al., 1998).

Apesar de diferentes formas de apresentação, a mais comum é a polineuropatia distal simétrica (PNDS), presente em mais de 90% dos casos, cuja característica é a de comprometimento sensório-motor, com sintomas que aparecem inicialmente em porções distais (padrão chamado “bota e luva”) e progridem de forma centrípeta (TESFAYE et al., 2013a; BOULTON et al., 2005). O diagnóstico pode ser realizado principalmente por meio de exame clínico, uso de questionários e testes sensoriais, embora possa ser empregado também testes eletrodiagnósticos (TESFAYE et al., 2013a). Dentre as 3 formas de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) a neuropatia ainda é a mais difícil de diagnosticar, controlar e tratar (VINIK, MEHRABYAN, 2004). Uma vez que as alterações patológicas da neuropatia diabética podem ser prévias aos sinais clínicos, torna-se necessário o diagnóstico breve e preciso (LV et al., 2015).

A progressão da polineuropatia diabética está associada a estágios que se sucedem. A princípio, um estágio metabólico, associado à disfunção nervosa, o qual é mais facilmente corrigido por alterações metabólicas, como o uso de medicamentos hipoglicemiantes. Tardamente, há a ocorrência de estágio composto de mudanças estruturais, as quais tornam-se progressivamente mais resistentes à restauração da homeostase metabólica (SIMA, 2003).

Os mecanismos responsáveis pela geração e manutenção da neuropatia diabética ainda não estão totalmente estabelecidos (KRISHNAN et al., 2008), embora acredite-se que esteja relacionado não somente ao estado hiperglicêmico em pacientes diabéticos tipo I e II, mas também a outros fatores (SHAW; CUMMINGS, 2005; DCCT RESEARCH GROUP, 1995). Neste contexto podem ser citados: a ativação exacerbada da via dos polióis, geração de estresse oxidativo; hipóxia associada à redução da perfusão nervosa; alteração na função do canal Na^+/K^+ -ATPase; glicosilação não enzimática e redução da produção de NO (SIMA; KAMIYA, 2006).

1.3 Dor Neuropática Diabética (DND)

Sintomas positivos e negativos são característicos das neuropatias, sendo os sintomas negativos referentes à perda de sensibilidade, como hipoalgesia e hipoestesia (BARON et al., 2010). Já os sintomas positivos são resultantes da alteração na percepção sensorial, tais como hiperalgesia e alodinia. Acredita-se que a dor neuropática diabética (DND) seja um dos sintomas mais constantes nesta população (BOULTON et al., 2004; MILLAN, 1998), afetando entre 15 a 50% dos pacientes diabéticos (JAVED et al., 2015; TESFAYE et al., 2013a).

Diferentemente da dor aguda (fisiológica), a dor neuropática é considerada uma patologia, pois assim como toda dor crônica, não serve a nenhum propósito fisiológico para a manutenção da integridade do indivíduo (KAPUR, 2003; MILLAN, 1998). Já a dor aguda a um determinado estímulo é considerada como vantajosa ao indivíduo que a possui, uma vez que visa à manutenção da integridade corpórea, frente a um estímulo que promova lesão tecidual (KWON et al., 2014; MILLAN et al., 2002). Esta forma de dor é o resultado da ativação das vias periféricas e centrais nociceptivas, cessando após a resolução da lesão tissular (MILLAN et al., 2002). Já a dor neuropática pode persistir por longo período até ser diagnosticada e tratada, pois em geral é resultante de alterações físicas, psicológicas e sociais além da lesão *per se* (STUCKY et al., 2001). A dor neuropática pode ser resultante de lesão ou disfunção em tecidos nervosos centrais e/ou periféricos, levando à ocorrência de sintomas dolorosos intensos mesmo quando da ausência de estímulo nociceptivo na área de abrangência do nervo afetado (KAPUR, 2003).

Com relação à DND, algumas de suas características incluem a sensação de queimação, choque elétrico, parestesias e hiperparestesias, além de dor em coceira profunda. Normalmente os sintomas dolorosos pioram durante o período noturno, cuja ocorrência é predominante em porções distais do corpo, como mãos e pés (BOULTON et al., 2004). A dor pode ser constante e acompanhada de alodinia cutânea, comprometendo a realização de tarefas diárias e a qualidade de vida dos indivíduos (ROSENBERG; WATSON, 2015; TESFAYE et al., 2013b), além de elevar em 3 vezes os gastos com tratamentos e cuidados em relação aos pacientes sem dor (BERGER et al., 2004).

De forma semelhante à neuropatia diabética, os mecanismos subjacentes à dor neuropática subjacente ainda não são completamente entendidos, embora existam diferentes hipóteses e estudos que tentam investigar as vias que podem causar esta forma de dor. Algumas destas hipóteses são: alterações no suprimento

1 vascular nervoso, ativação glial, mudanças no padrão de expressão dos canais
2 iônicos e mais recentemente, mudanças relacionadas à transmissão do impulso
3 nociceptivo, como a desregulação do tônus do sistema inibitório descendente (para
4 revisão, ver: TESFAYE et al., 2013a).

5

6 **1.4 Tratamento da DND**

7 Outra importante característica das dores neuropáticas, como é o caso da
8 DND, é a dificuldade quanto ao tratamento farmacológico (ROSENBERG; WATSON,
9 2015). Tal dificuldade reflete-se no fato de que apenas um terço dos pacientes sob
10 tratamento alcança alívio analgésico superior a 50% (SAID, 2007). Pacientes com
11 DND geralmente são refratários aos esquemas terapêuticos comumente utilizados
12 na prática clínica, como por exemplo, a morfina (GILRON et al., 2005; BOULTON et
13 al., 1998), fato também observado em modelos experimentais de diabetes
14 (CEGIELSKA-PERUN et al., 2014; CHEN; PAN, 2002).

15 Apesar de diferentes drogas apresentarem boas perspectivas em testes pré-
16 clínicos, de modo geral demonstraram-se pouco eficazes ao chegarem ao
17 consultório (BHATTACHARYA et al., 2009), levando à demanda de estudos clínicos
18 comparativos entre diferentes tratamentos (DWORKIN, 2013). Tal ineficácia pode
19 ser devida ao início tardio do tratamento em relação à história natural da doença,
20 doses sub ótimas ou o curto tempo de tratamento com os pacientes (SIMA; KAMIYA,
21 2006), ou também devido à ampla gama de mecanismos potencialmente
22 relacionados a esta complicação do diabetes (TESFAYE et al., 2013a).

23 Como primeira medida a ser tomada, deve ser assumido o estrito controle
24 glicêmico, uma vez que uma das causas que levam ao quadro são as alterações
25 diretamente causadas pela hiperglicemia. Esta medida tende a postergar o
26 aparecimento da neuropatia (REICHARD et al., 1996; DCCT RESEARCH GROUP,
27 1995). Todavia, ainda há a chance de haver sintomas, pois a proteção dada pelo
28 rígido controle da glicemia não é completa. Assim, a reversão do quadro (ou seja, a
29 redução dos sintomas) é limitada, tornando o principal objetivo do tratamento
30 prevenir ou dificultar a progressão da doença (ROSENBERG; WATSON, 2015).

31 Há, entretanto, alguns medicamentos testados e aprovados pelo FDA (*US*
32 *Food and Drug Administration*) para o uso em pacientes com DND, como a
33 pregabalina, tapentadol e a duloxetina (FREEMAN, 2013). A duloxetina, aprovada

1 em 2004, foi o primeiro dentre os atuais medicamentos aprovados para o tratamento
2 da DND, pertencente à classe dos antidepressivos cujo mecanismo é a inibição dual
3 da recaptação tanto de serotonina quanto de noradrenalina, importantes
4 neurotransmissores envolvidos na modulação descendente inibitória da dor (JAVED
5 et al., 2015). Já a pregabalina, também aprovada no ano de 2004, é o
6 gabapentinoide de maior potência, atuando por meio da inibição da inserção da
7 subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de Ca^{2+} na membrana do corno dorsal da medula (DH),
8 reduzindo a taxa de liberação de neurotransmissores (JAVED et al., 2015; PELTIER
9 et al., 2014). Já o tapentadol, é a única droga que conta com dois diferentes
10 mecanismos, atuando como agonista sobre receptores MOP e também inibindo a
11 recaptação de noradrenalina, tendo sido a droga mais recentemente lançada no
12 mercado (2012), com formulação de liberação lenta (PELTIER et al., 2014;
13 FREEMAN, 2013).

14 Assim, dentre as drogas aprovadas pelo FDA para o manejo da DND, a
15 duloxetina e o tapentadol possuem ação sobre os sistemas descendentes de
16 modulação da dor (KWON et al., 2014; NIESTERS et al., 2013). Mesmo assim, as
17 drogas voltadas ao uso para a DND raramente alcançam o objetivo maior de
18 erradicar a dor. Neste sentido, acredita-se que a combinação de diferentes
19 modalidades de tratamento, com diferentes mecanismos de ação sejam necessários
20 para o estabelecimento de esquema analgésico adequado ao paciente
21 (ROSENBERG; WATSON, 2015). Mesmo o uso combinado de drogas aprovadas
22 especificamente para tal finalidade não se demonstrou mais eficaz que a
23 monoterapia (TESFAYE et al., 2013a), revelando a necessidade da busca por novas
24 opções de tratamento neste campo.

25 Atualmente, há a tendência crescente à personalização dos tratamentos
26 (BOUHASSIRA et al., 2014; FINNERUP et al., 2013) buscando direcioná-lo de o
27 mais precisamente ao mecanismo subjacente à dor (BOULTON et al., 2005). Tal
28 individualização se dá, pois grande parte dos esquemas terapêuticos, especialmente
29 os baseados em monoterapias, perdem sua capacidade dentro de período de 3
30 anos, ao passo que a mortalidade e morbidade relacionadas ao diabetes persistem
31 (KLEINBERGER, POLLIN, 2015; TEFAYE et al., 2013a). Assim, torna-se
32 necessária a investigação de mecanismos subjacentes à DND e que possam ser
33 explorados na produção de medicamentos mais eficazes no manejo desta dor
34 neuropática. Um dos mecanismos propostos a estar envolvido na
35 geração/manutenção das alterações sensoriais em pacientes diabéticos é o

1 desbalanço entre o sistema facilitatório e o sistema descendente inibitório, como
2 comentado anteriormente. Sabe-se que a desregulação neste sistema é um dos
3 processos relacionados às dores crônicas (BANNISTER et al., 2015; KWON et al.,
4 2014), havendo uma alteração do tônus deste sistema, tendendo a ser mais
5 facilitatório do que inibitório em pacientes diabéticos (PETROU et al., 2012, para
6 revisão, ver: KAPUR, 2003) e em modelos animais de diabetes (SILVA et al., 2013;
7 MORGADO et al., 2010; PAULSON et al., 2007). Assim, dada a importância deste
8 sistema para o efeito de alguns dos medicamentos utilizados na prática clínica e
9 também pelas alterações decorrentes do diabetes em sua função, o foco deste
10 trabalho foi o de avaliar se esta via pode estar em desbalanço e fazer parte da
11 fisiopatologia da DND.

12

13 **1.5 Sistema Inibitório Descendente**

14 Sabe-se que a transmissão da informação nociceptiva não é como uma via de
15 mão única, levando-a simplesmente da periferia até a medula espinhal e de lá para o
16 encéfalo, onde é entendida como dor. Muito pelo contrário, a informação recebida
17 pode sofrer diferentes processos de modulação (KWON et al., 2014). Uma das
18 formas de controlar o *input* nociceptivo é a modulação descendente que parte do
19 encéfalo e altera a excitabilidade na medula espinhal (GEBHART, 2004).
20 Classicamente, este sistema foi determinado por Reynolds, cujo trabalho
21 demonstrou que o estímulo na substância cinzenta periaquedutal (PAG; do inglês
22 *periaqueductal grey*), uma área mesencefálica, tornaria possível realizar cirurgia
23 abdominal em roedores sem o uso de anestésicos (REYNOLDS, 1969). Dentre as
24 diferentes colunas da PAG, a ventrolateral mostrou-se ser a mais envolvida com a
25 geração desta modulação inibitória (antinociceptiva), além de ser sítio de ligação aos
26 opioides, cuja administração nesta região mimetiza os efeitos da estimulação elétrica
27 (YAKSH; RUDY, 1978).

28 Após a identificação deste sítio, foi descoberto que a passagem desta forma
29 de modulação é dependente de outra área, bulbo rostroventromedial (RVM; do
30 inglês *rostral ventromedial medulla*), a qual canaliza as informações recebidas pela
31 PAG a partir de diferentes áreas encefálicas como córtex, tálamo, hipotálamo,
32 mesencéfalo, dentre outras (MANTYH, 1983). A PAG possui número limitado de
33 projeções para o DH, sendo que boa parte das suas aferências está ligada ao RVM
34 e o tegmento pontino dorsolateral para a função descendente inibitória. Enquanto o

1 RVM emite projeções diretamente para o DH, o tegmento pontino dorsolateral emite
2 projeções ao longo da medula, que por fim alcançam também o DH (PORRECA et
3 al., 2002).

4 Da mesma forma como a PAG recebe aferências de diferentes estruturas, no
5 RVM também chegam informações de outras regiões além da PAG, tais como o
6 núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário e outras estruturas supraespinais
7 envolvidas no recebimento e processamento da informação nociceptiva (MILLAN,
8 1998). O RVM possui a capacidade de modular de forma inibitória, facilitatória ou
9 promover uma resposta bifásica sobre a informação nociceptiva na medula, frente a
10 um estímulo nociceptivo (GEBHART, 2004), de modo que é possível entender que
11 esta forma de modulação pode servir tanto para fins de antinocicepção quanto de
12 pronocicepção (KWON et al., 2014). Esta modulação da informação pode seguir por
13 caminhos distintos dependendo de sua “polaridade”: se facilitatória, alcança a
14 medula por meio da coluna ventral e ventrolateral, ao passo que se inibitória,
15 descende através do funículo dorsolateral (GEBHART, 2004). Assim, há a formação
16 do eixo PAG-RVM-DH (KWON et al., 2014).

17 Dois tipos celulares distintos, as células ON e OFF foram identificadas no
18 RVM como células responsáveis pelo processo de modificação do *input* nociceptivo.
19 As células OFF são estimuladas por opioides e inibidas (apresentam redução em
20 sua frequência de disparo) por estímulos nocivos, ao contrário das células ON as
21 quais apresentam aumento de sua frequência de disparo em resposta a um estímulo
22 nocivo. Assim, acredita-se que as células OFF possuam papel na inibição
23 descendente, bloqueando a ascendência do input nociceptivo, ao passo que as
24 células ON participariam da facilitação descendente (FIELDS et al., 1991). Há
25 também as células neutras, cujo padrão de disparo não é alterado na presença ou
26 ausência de estímulo nocivo, sendo seu papel na anti ou nocicepção ainda incerto
27 (FIELDS et al., 1983). Embora investigadas primordialmente no RVM, as células ON
28 e OFF já foram identificadas igualmente na PAG (HEINRICHER et al., 1987).

29 Determinou-se que tanto a estimulação elétrica da PAG, assim como a
30 estimulação por meio da administração de aminoácidos excitatórios pode evocar
31 antinocicepção, dadas as vias que interligam PAG e RVM. A partir do RVM partem
32 aferências para a medula espinal, onde há a modulação do *input* nociceptivo
33 (GEBHART, 2004). Entretanto, o fato de que opioides também podem causar efeito
34 similar ao da ativação da via, e dado que estes analgésicos promovem inibição
35 neuronal (ação mediada por proteína G_i), poderia ser entendido como controverso

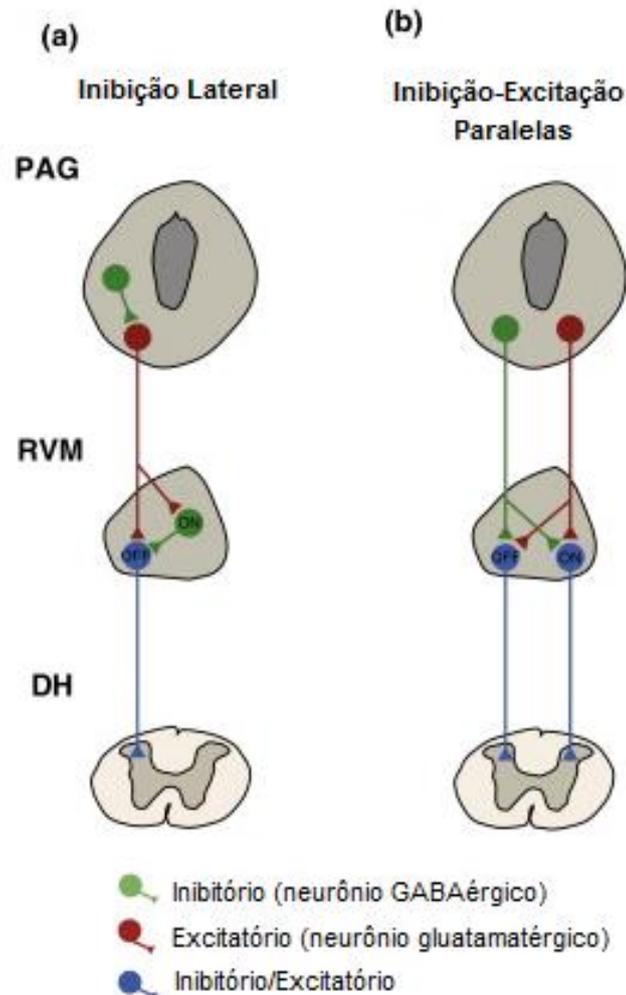
1 em relação ao já exposto. Para explicar tal mecanismo, foi proposta a existência de
2 interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos localizados na PAG (as células ON),
3 os quais liberam GABA e produzem a inibição de neurônios de projeção para a
4 medula (células OFF) por meio de sua ligação a receptores GABA_A. Acredita-se que
5 os opioides realizem o bloqueio de tais interneurônios, retirando a inibição
6 gabaérgica presente neste sistema (BASBAUM; FIELDS, 1984) (Figura 1, Painel A).

7 Há também uma visão alternativa sobre este mecanismo (CLEARY et al.,
8 2008), a qual descreve que a redução na taxa de disparo de células OFF não é
9 precedida pelo aumento da taxa de disparo de células ON frente ao estímulo nocivo,
10 como é postulado. Diferentemente, a redução na atividade das células OFF é
11 anterior ao aumento da taxa de disparo das células ON, levando à ideia de que as
12 células OFF podem modular as células ON, ou ainda de células ON e OFF (ou
13 subpopulações) podem formar vias independentes inervando o DH (Figura 1, Painel
14 B).

15 A modulação da informação nociceptiva na medula é amplamente direcionada
16 por vias monoaminérgicas, especialmente a serotonina, a noradrenalina e a
17 dopamina (KWON et al., 2014). No tronco encefálico, a serotonina proveniente do
18 RVM e a noradrenalina produzida no tegmento pontino dorsolateral formam parte do
19 sistema inibitório descendente (FIELDS et al., 1991). Já a inervação dopaminérgica
20 origina-se essencialmente no hipotálamo anterior, mais especificamente na região
21 A11 (PAULUS; TRENKWALDER, 2006).

22 Especialmente a serotonina e a noradrenalina modulam a entrada da
23 informação nociceptiva a nível medular, modificando a excitabilidade da membrana
24 de neurônios de projeção ou interneurônios localizados no DH, facilitando ou
25 dificultando a passagem da informação (para revisão ver KWON et al., 2014;
26 MILLAN, 2002). A noradrenalina, atuando sobre receptores α 1 pós sinápticos
27 presentes em interneurônios inibitórios, assim como em receptores α 2 pré e pós
28 sinápticos, possui papel antinociceptivo. Já a serotonina, dependendo do tipo de
29 receptor ao qual se liga, pode evocar efeitos anti ou pro nociceptivos: ao ativar
30 receptores 5HT₁ (pré no caso das isoformas 5HT_{1B/1D}, e pós sinápticos no caso de
31 5HT_{1A}), há efeito antinociceptivo, enquanto a ativação de receptores 5HT₂ e 5HT₃
32 promovem efeito pró nociceptivo. No caso da dopamina, receptores D1 (pós
33 sinápticos) e D2/D3 (pré sinápticos) estão presentes tanto na lâmina I do DH quando

- 1 nos aferentes primários, levando a efeitos pró e antinociceptivos, respectivamente
 2 (para revisão ver: KWON et al., 2014).



3 Fig 1 – Teorias das diferentes formas de modulação descendente do eixo PAG (substância
 4 cinzenta periaquedutal) - RVM- (bulbo rostroventromedial) – DH (corno dorsal da medula). Painel A:
 5 modelo da inibição lateral. De acordo com esta teoria, a presença de interneurônios GABAérgicos
 6 modulam a atividade de outros neurônios aferentes que formam a via antinociceptiva. Opioides
 7 promovem a inibição destes interneurônios GABAérgicos, promovendo a desinibição da via
 8 descendente. Painel B: modelo da inibição/excitação paralela: nesta visão alternativa, as vias
 9 excitatórias e inibitórias ocorrem de modo paralelo a partir do RVM, alcançando a medula. A ação de
 10 opioides se daria de modo independente para promover antinocicepção ou pronocicepção. Adaptado
 11 de Lau, Vaughan, 2014.

12

13 Em diferentes tipos de dores crônicas, como resultado da plasticidade
 14 neuronal, ocorre redução no tônus descendente inibitório e aumento da
 15 excitabilidade de neurônios medulares, associado à queda na atividade de

1 interneurônios inibitórios (gabaérgicos ou glicinérgicos). Estas mudanças acarretam
2 em alterações no limiar de dor, além de irradiação da sensação dolorosa para
3 tecidos não lesionados, como resultado da sensibilização central (KWON et al.,
4 2014). Há, inclusive, em diferentes estudos com dor crônica, como a dor crônica
5 lombar (YU et al., 2014) e do câncer (HUANG et al., 2014a) elementos que
6 demonstram que este sistema pode estar em desbalanço. Da mesma forma, em
7 modelo de dor neuropática também se observou que alterações no sistema
8 descendente podem estar relacionadas ao aparecimento de alodinia e hiperalgesia
9 (MONHEMIUS et al., 2001; BIAN et al., 1998).

10 Devido a tais alterações, os mecanismos endógenos (descendentes)
11 relacionados à modulação da sensação dolorosa associados à produção de
12 monoaminas são creditadas como possíveis alvos no manejo terapêutico das dores
13 crônicas (KWON et al., 2014). Ademais, é importante salientar que algumas das
14 drogas aprovadas pelo FDA para uso na DND possuem ação sobre mecanismos
15 endógenos de analgesia, relacionados à serotonina e noradrenalina (NIESTERS et
16 al., 2014; YARNITSKY et al., 2012). Dada a importância deste sistema para o
17 controle endógeno da dor, e suas alterações em quadros de dor crônica, nós
18 optamos por investigar melhor um dos sistemas envolvidos no sistema descendente
19 inibitório: o serotoninérgico.

20

21 **1.6 Alterações na via Descendente e Serotoninérgica no Diabetes**

22 Além de caracterizado em diferentes tipos de dores neuropáticas (para
23 revisão ver: KWON et al., 2014), na DND tanto o desbalanço da via descendente em
24 si como do tônus serotoninérgico já foram verificados. Em modelo pré-clínico de dor
25 neuropática diabética, foi encontrada desregulação da modulação descendente
26 (SILVA et al., 2013; MORGADO et al., 2010; PAULSON et al., 2007). Mais
27 especificamente, observou-se não somente que a atividade espontânea, mas
28 também o número de células OFF estava reduzida, levando à facilitação da
29 transmissão nociceptiva (SILVA et al., 2013). Outro trabalho encontrou redução da
30 atividade na PAG de animais diabéticos, contraposta pelo aumento no córtex
31 somatosensorial (PAULSON et al., 2007). Já em pacientes com sintomas positivos
32 da neuropatia diabética há menor tônus inibitório descendente no DH (PETROU et
33 al., 2012, para revisão, ver: KAPUR, 2003), associado à maior excitabilidade de

1 neurônios espinhais (PERTOVAARA et al., 2001) o que pode significar o
2 comprometimento das funções normais de transmissão e modulação no diabetes.

3 Da mesma forma, o tônus serotoninérgico no diabetes também parece estar
4 comprometido, com redução dos níveis desta amina nas regiões do tronco
5 encefálico (EZZELDIN et al., 2014) e medula (HENLEY; BELUSH, 1992). É
6 interessante citar que foi demonstrado que no RVM, importante sítio de ação dos
7 opioides, a produção de serotonina não é alterada frente à administração de morfina
8 (SOUNVORAVONG et al., 2004), o que pode estar em parte correlacionado à
9 refratariedade da ação desta classe de analgésicos no diabetes. Em modelo de
10 diabetes tipo 1, foi verificada a redução de L-Trp, da enzima triptofano 5-hidroxilase
11 (TpH, responsável pela conversão do triptofano em 5-OH-Trp, precursor da
12 serotonina) e de serotonina tanto no córtex como no tronco encefálico. O tratamento
13 com o hipoglicemiante insulina promove normalização nos níveis de 5HT, sem afetar
14 os níveis de L-Trp, indicando que este mecanismo de normalização possa estar
15 relacionado à mudança na cinética da enzima formadora da 5HT (MANJARREZ-
16 GUTIÉRREZ et al., 2000). Neste sentido, outro estudo demonstrou que a enzima
17 TpH possui menor afinidade pelo L-Trp e menor atividade enzimática no cérebro de
18 animais diabéticos (HERRERA et al., 2005). Além disso, o *turnover* de serotonina,
19 mensurada pela relação dos níveis de ácido 5-hidroxiindolacético/ serotonina no
20 tronco encefálico, é menor em animais diabéticos, (HENLEY; BELLUSH, 1992). Por
21 outro lado, dados apontam que o número de células expressando TpH no RVM,
22 assim como os níveis de serotonina medulares foram maiores em animais diabéticos
23 (DM tipo 1) em relação aos animais controle (MORGADO et al., 2011),
24 provavelmente como mecanismo para contrabalançar o tônus nociceptivo
25 aumentado.

26 As causas que promovem tanto a redução do tônus descendente inibitório
27 quanto do sistema serotoninérgico não são completamente compreendidos, apesar
28 das diferentes informações a respeito destas alterações. Contudo, acreditamos que
29 a redução da produção de serotonina e a formação de metabólitos neurotóxicos e
30 pró-oxidantes, conforme descrito na sequência, estejam associados ao desvio na via
31 de formação da 5HT pela via indolamina 2,3 dioxigenase (IDO).

1.7 Via indolamina 2,3 Dioxigenase (IDO)

O triptofano (Trp), um aminoácido essencial para os seres humanos, é o precursor de proteínas e de importantes moléculas regulatórias, como a serotonina (GROHMANN et al., 2003) e melatonina (SHIBATA; FUKUWATARI, 2012). Entretanto, acredita-se que cerca de 90% das vias metabólicas periféricas envolvendo o Trp terminem na produção das chamadas quinureninas (Kyn), moléculas com diferentes atividades biológicas, tais como a interação com receptores NMDA, estímulo ao estresse oxidativo e modulação imunológica (OXENKRUG et al., 2013; SCHWARCZ, PELICCARI, 2002; LEKLEM, 1971). Esta via é catalisada pelas enzimas passo-limitante indolamina 2,3-dioxigenase (IDO, isoformas 1 e 2) ou triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) (SCHWARCZ et al., 2012), que promovem a degradação do anel indol de moléculas por meio de reação dependente de oxigênio molecular (GROHMANN et al., 2003).

Inicialmente, esta via foi determinada como parte de um mecanismo antimicrobiano associado à depleção extracelular de Trp, devido ao fato de que a pequena biodisponibilidade desta molécula retardar o crescimento de patógenos e também de células (SCHWARCZ; PELICCARI, 2002). Posteriormente, outros papéis também foram atribuídos à ação da via, especialmente aqueles relativos à tolerância e imunossupressão. Um dos estudos que trouxe a importância da via à tona foi o de Munn e colaboradores, que identificou na redução da ativação de células T maternas por meio da depleção de Trp um mecanismo de tolerância materna ao feto, permitindo o prosseguimento da gestação (MUNN et al., 1998). Mais recentemente, outras funções da via, especialmente relacionadas à ativação de IDO, foram descritas, como na pesquisa do câncer (para revisão, ver: LÖB et al., 2009), aterosclerose (POLYZOS et al., 2015) e doenças psiquiátricas (para revisão, ver: WIDNER et al., 2002; SCHWACZ et al., 2012). Tanto a depleção do Trp quanto a formação de quinureninas está associada aos diferentes efeitos observados nestas patologias (WIDNER et al., 2002).

Existem duas isoformas da enzima IDO, chamadas de IDO1 e IDO2, cujos genes são bastante conservados e presentes em sequência no mesmo cromossomo em mamíferos. Sabe-se que IDO1 reconhece ambos os isômeros do aminoácido Trp, embora sua afinidade seja maior para a forma levógira, uma vez que os aminoácidos prevalecem nesta forma em mamíferos (LÖB et al., 2009). Não se conhecem as exatas funções da isoforma IDO2, embora a depleção de L-Trp e a

1 formação de quinureninas, atividades análogas às da isoforma IDO1, sejam
2 observadas em células expressando esta IDO2. Comparativamente, a isoforma
3 IDO2 apresenta atividade enzimática bastante reduzida quando comparada à IDO1
4 (BALL et al., 2007). Ambas as isoformas (IDO1 e IDO2) podem ser bloqueadas com
5 o uso de inibidor, o 1-L-metil triptofano (YUASA et al., 2010), embora alguns estudos
6 demonstrem que a forma levógira do inibidor seja mais seletiva para IDO1, ao passo
7 que o isômero D bloqueie mais especificamente a isoforma IDO2 (CADY; SONO,
8 1992).

9 Com relação ao mecanismo de indução da expressão da IDO, sabe-se que é
10 regulada pelo processo inflamatório e suas vias associadas, sendo uma delas a via
11 de sinalização JAK (*Janus kinase*)/STAT1 (*signal transducers and activators of*
12 *transcription*), um mecanismo intracelular comum a diferentes citocinas
13 (ARUMUGGAM et al., 2015; KIM et al., 2012; ZHONG et al., 1999). Esta via
14 depende da ativação de receptores pertencentes à superfamília de receptores de
15 citocinas, havendo fosforilação do resíduo de tirosina de JAK1 e JAK2, e estas
16 fosforilam a proteína STAT1 em outro resíduo de tirosina. A proteína quinase C
17 (PKC; *protein kinase C*) também é fosforilada e ativa a STAT1 de maneira similar À
18 JAK. Após ativação, STAT1 forma homodímeros que translocam do citoplasma para
19 o núcleo (para revisão, ver: MELLOR; MUNN, 2004). Lá, há a associação entre o
20 dímero STAT1 e o fator regulatório de interferon (IRF; *interferon regulatory factor*)
21 que por fim leva à transcrição do RNAm para IDO (CHENG et al., 2010). Para a
22 formação da proteína são necessários diferentes processos regulatórios pós
23 traducionais, como a inserção de um grupamento heme (para revisão, ver: MELLOR;
24 MUNN, 2004).

25 IDO (1/2) e TDO diferem em termos do padrão de expressão tecidual. Apesar
26 de a TDO ser chamada de isoforma hepática, sua presença já foi constatada em
27 outros órgãos, tais como a placenta, útero, testículo e cérebro (para revisão, ver:
28 LÖB et al., 2009). Já a IDO (1/2) está presente na próstata, epidídimo, placenta,
29 fígado, timo, pulmões, trato digestivo (DAI; ZHU, 2010), cérebro, rins, células
30 dendríticas e outros tipos celulares (SOLIMAN et al., 2010). Além disso, as isoformas
31 IDO e TDO diferem quanto ao peso molecular e quanto à forma de indução da
32 expressão: a enzima IDO é mais leve (45 KDa) e formada por estrutura monomérica,
33 tendo sua expressão induzida por diferentes fatores pró inflamatórios (interferon
34 gama (INF- γ), interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e
35 lipopolissacarídeo) (THACKRAY et al., 2008). Já a TDO apresenta massa molecular

1 de 143 KDa contidos em homotetrâmero, tendo sua expressão estimulada por
2 hormônios do estresse, como o cortisol, prolactina e também pelo próprio substrato,
3 o Trp (OXENKRUG, 2007).

4

5 **1.8 Via das Quinureninas**

6 As principais moléculas derivadas do metabolismo do Trp mediado pelaIDO
7 são as chamadas quinureninas, resultado da estimulação da via por fatores pró-
8 inflamatórios (LÖB et al., 2014). Com a ação daIDO, há a conversão dependente de
9 oxigênio molecular do L-Trp em N-formil quinurenina, (HIRATA et al., 1975), a qual é
10 transformada em L-quinurenina (KYN) pela ação da N-formamidase (GROHMANN et
11 al., 2003). A KYN pode sofrer três tipos de metabolização: a formação de ácido
12 quinurênico (KYNA) via ação da quinurenina aminotransferase (KAT) ou via
13 quinurenina monooxigenase (KMO), levando à formação de 3-hidroxiquinurenina (3-
14 HK), a qual é convertida pela quinureninase (KYNU), em ácido 3-hidroxiantranílico
15 (3-HAA) e por fim, convertido em ácido quinolínico (QUIN) (SCHWARCZ et al.,
16 2012). Por fim, a KYN também pode formar o ácido antranílico (AA) pela ação da
17 enzima KYNU. 3-HK pode sofrer também metabolização pela KAT, levando à
18 formação de ácido xanturênico (XA) (OXENKRUG, 2013; GROHMANN et al., 2003),
19 como demonstrado na figura 1. Todas as enzimas *downstream* da via (KMO, KAT,
20 KYNU) são dependentes da presença de piridoxal-5-fosfato, a forma ativa da
21 vitamina B6, e em especial a KYNU, de modo que situações de restrição de vitamina
22 B6 podem levar ao desvio da via para a formação de XA (OXENKRUG, 2013).

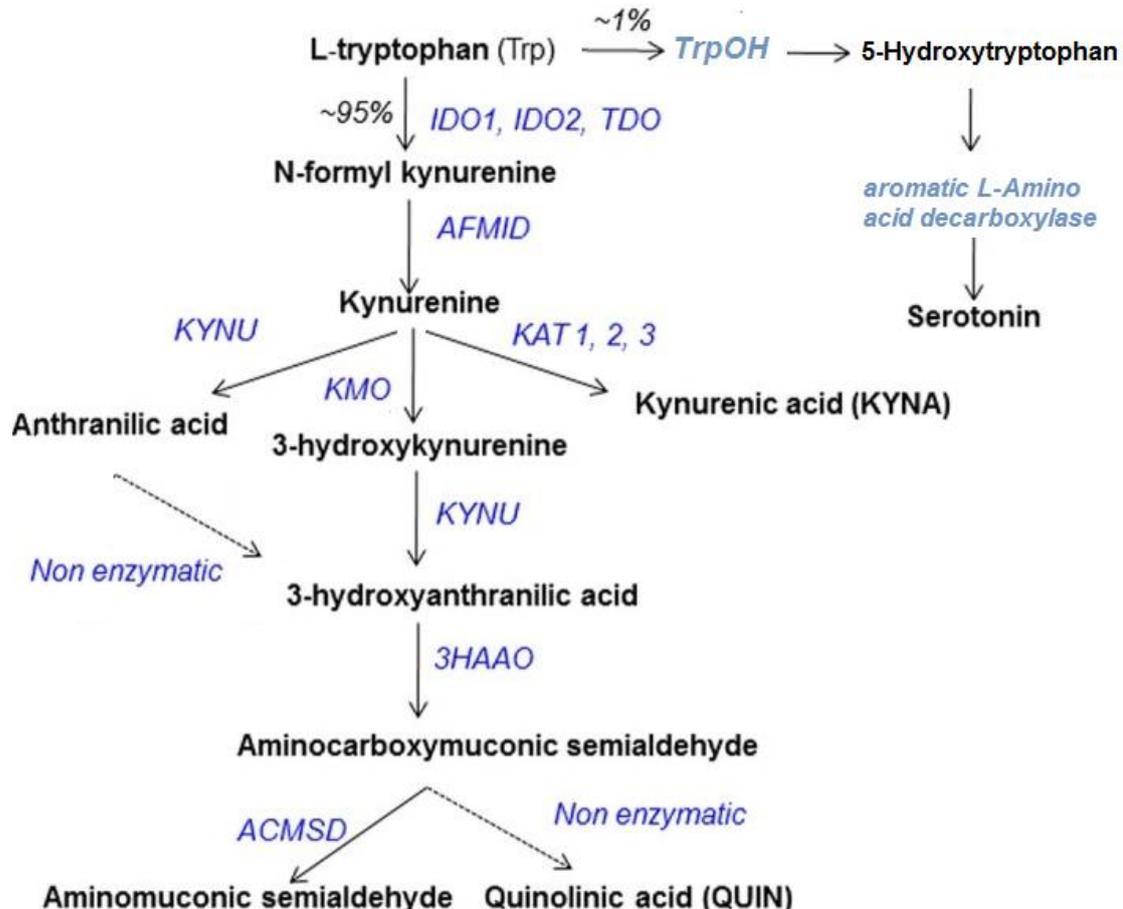
23 Quanto às atividades biológicas das quinureninas, o ácido quinolínico (QUIN)
24 agonista de receptores NMDA, podendo causar apoptose e necrose por vias
25 associadas ao próprio receptor NMDA. Já o ácido quinurênico (KYNA) é um
26 antagonista de receptores NMDA e nicotínicos. A molécula 3-hidroxiquinurenina (3-
27 HK) é capaz de gerar espécies reativas de O₂, também possuindo efeito neurotóxico
28 (para revisão, ver SCHWARCZ; PELLICCIARI, 2002).

29

30 **1.9 Via das Quinureninas e Processos Patológicos**

31 Devido ao papel essencial do Trp e das moléculas diretamente associadas
32 podem ser moduladas pela ação daIDO, diferentes processos fisiopatológicos

1 também podem ser alterados por esta enzima, como por exemplo, situações com
 2 ativação sustentada do sistema imune, levando à depleção do Trp, e como
 3 consequência, acúmulo de quinureninas e queda nas funções serotoninérgicas
 4 (WIDNER et al., 2002).



5

6 Fig 2: Via IDO1/KYN de metabolismo do aminoácido triptofano (Trp) e formação das
 7 quinureninas (Kyn) pela enzima passo limitante indolamina 2,3-dioxigenase (IDO1) ou suas
 8 isoformas, ou da serotonina, pelas enzimas TrpOH e descaroxilase de L- aminoácidos aromáticos.
 9 Adaptado de WU et al., 2013.

10 Esta via IDO/quinureninas vem sendo amplamente estudada no contexto da
 11 imunologia (para revisão, ver: GROHMANN et al., 2003), mas também de outras
 12 patologias, como a depressão e o diabetes (DA SILVA DIAS et al., 2015;
 13 OXENKRUG et al., 2013). Em diferentes estudos relacionando o comportamento
 14 tipo-depressivo e nocicepção em modelo de dor inflamatória e neuropática, foram
 15 encontrados resultados opostos quanto ao papel da enzima IDO no surgimento das
 16 alterações sensoriais (ZHOU et al., 2015; KIM et al., 2012). Já em pacientes
 17 depressivos e com dor, foi relatado tanto o aumento da expressão como da atividade

1 da enzima IDO (KIM et al., 2012). Estudos recentes vêm observando a relevância da
2 via IDO/quinurenina em processos de dor crônica: um deles demonstrou que a KMO,
3 uma das enzimas da via, está relacionada ao processo de alterações sensoriais em
4 animais submetidos ao modelo de dor neuropática induzida por transecção de nervo
5 periférico (ROJEWSKA et al., 2016), uma vez que razão Kyn/Trp plasmática
6 apresenta-se aumentada nestes animais. Em estudo recente utilizando infecção pelo
7 vírus da leucemia murina (modelo que mimetiza a infecção por HIV em humanos), foi
8 observado que após a inoculação há instalação de alterações sensoriais crônicas,
9 ocorrendo paralelamente ao aumento da expressão da enzima IDO1 em tecido
10 linfóide (baço), mas não em tecido nervoso central. Além disso, animais sem o
11 inóculo viral, mas que receberam quinureninas apresentam quadro de disfunção
12 sensorial similar ao do grupo inoculado (HUANG et al., 2016).

13 Algumas quinureninas estão presentes em maiores concentrações no plasma
14 de indivíduos com DM tipo 2, e por isso parecem ter possíveis efeitos chamados de
15 diabetogênicos em populações com pré-diabetes, pois afetam a liberação de insulina
16 (OXENKRUG, 2013). Além disso, estas moléculas também parecem estar
17 associadas à indução do quadro diabético tipo 1 (GROHMANN et al., 2003), assim
18 como serem produzidas de forma aumentada nos hepatócitos de animais com DM
19 tipo 1 induzido experimentalmente (SASAKI et al., 2009). Contudo, sabendo-se da
20 importância das alterações sensoriais na população diabética, e conhecendo-se a
21 relevância de distúrbios na modulação descendente em quadros de dor crônica, não
22 há estudos clínicos ou com modelos acerca da contribuição da via indolamina 2,3-
23 dioxigenase 1 (IDO1) ou da produção de quinureninas na geração ou manutenção
24 de tais alterações sensoriais, visto que esta via está associada à redução do tônus
25 serotoninérgico.

26

27 **2. HIPÓTESE**

28

29 A via indolamina 2,3 dioxigenase está mais ativa em animais diabéticos, levando
30 à queda nos níveis de serotonina e aumentando a produção de quinureninas. Há,
31 desta forma, menor tônus do sistema inibitório descendente e maior concentração de
32 quinureninas neurotóxicas, tornando esta via em parte responsável pelas alterações
33 sensoriais em animais diabéticos.

34

35 **3. OBJETIVOS**

3.1 Objetivo Geral

Investigar o envolvimento da via indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) na alodinia mecânica associada ao diabetes experimental induzido por estreptozotocina em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

Analisar o padrão temporal das alterações do limiar mecânico (alodinia mecânica) em animais diabéticos;

Quantificar os níveis de serotonina e ácido 5 hidroxindolacético no cordão espinhal de animais diabéticos;

Verificar o efeito do tratamento sub crônico com fluoxetina, inibidor da recaptação de serotonina, sobre a alodinia mecânica em animais diabéticos;

Avaliar a expressão e o padrão de expressão da enzima IDO no cordão espinhal de animais diabéticos;

Investigar o efeito do tratamento com 1-L-metil triptofano, um antagonista da enzima IDO sobre a alodinia mecânica em animais diabéticos;

Analisar o perfil de citocinas pró-inflamatórias indutoras da expressão de IDO1 (TNF α , IL-6 e IL-1 β) no cordão espinhal de animais diabéticos;

Investigar o perfil de ativação de células gliais (astrócitos e microglia) em cordão espinhal de animais diabéticos;

Averiguar a expressão da enzima KMO no cordão espinhal de animais diabéticos;

Investigar o efeito do tratamento com JM-6, um antagonista da enzima KMO sobre a alodinia mecânica de animais diabéticos;

Determinar o efeito do tratamento intratecal com MK-801, um antagonista de receptores NMDA, sobre a alodinia mecânica em animais diabéticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas, Soluções e Grupos experimentais.

1 Para este estudo, foram utilizadas as seguintes drogas e soluções:
2 estreptozotocina (Stz, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EUA –
3 droga diabetogênica) e citrato de sódio (Merck S.A. Indústrias Farmacêuticas, São
4 Paulo, São Paulo, Brasil) para a indução ao quadro diabético. Cloridrato de
5 Fluoxetina, cloridrato de N-metil-3-fenil-3-[(a,a,a-trifluoro-p-tolil)-oxi] propilamina,
6 bloqueador da recaptção de serotonina (Daforin®, SEM Laboratórios, Hortolândia,
7 SP); 1-L-MT, 1-L-metil triptofano, inibidor seletivo da IDO1 (Sigma Aldrich, St. Louis,
8 MO, EUA); MK-801, (5S,10R)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-
9 5,10-imino maleato, antagonista potente e não seletivo de receptores NMDA (Tocris,
10 Bristol, Reino Unido); JM-6 ((3,4-Dimethoxibenzenesulfonilamino)-4-(3-nitrophenil)-5-
11 (piperidin-1-il)metiltiazol), pró droga do inibidor da KMO (Merck Millipore, Darmstadt,
12 Alemanha). Para a diluição da STZ foi utilizada solução de citrato de sódio a 10 mM,
13 pH 4,5. O cloridrato de fluoxetina, comercializado em forma líquida, foi administrado
14 uma vez ao dia por 14 dias a partir da 2ª semana pós indução ao diabetes (nas
15 doses de 3, 10, 15 e 20 mg/Kg). O 1-L-MT foi inicialmente diluído em solução de
16 hidróxido de sódio 0,1 N, seguida de correção para pH fisiológico, sendo utilizado
17 em animais já diabéticos (3 e 4 semanas pós indução) de forma aguda e sistêmica
18 (nas doses de 3, 6 e 9 mg/Kg i.p.). O JM-6, após diluição em solução salina 0,9%, foi
19 administrado agudamente nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg após 4 semanas da
20 indução ao estado diabético. O MK-801, diluído de forma similar ao JM-6, foi
21 utilizado nas doses de 0,1, 0,5 e 1 nmol pela via intratecal, conforme metodologia
22 previamente publicada (MESTRE et al., 1994), em animais diabéticos por 4
23 semanas.

24

25 4.2 Animais

26 Foram utilizados ratos da variedade Wistar machos provenientes do biotério
27 da Universidade Federal do Paraná, com peso entre 180 a 200 gramas. Foram
28 mantidos sob condições de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) e luz constants (ciclo claro escuro
29 de 12 horas), com água e ração (marca Nuvital®) ad libitum em numero reduzido por
30 caixa. As trocas de caixas foram realizadas diariamente, a fim de evitar o sofrimento
31 animal. Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com as normas e
32 legislações contidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR
33 (CEUA #748).

4.3 Indução ao diabetes experimental

Após jejum prévio de 12 horas, os animais do grupo diabético receberam via i.p. 60 mg/kg de estreptozotocina (STZ) diluída em tampão citrato (10 mM, pH 4,5). Os animais do grupo normoglicêmico receberam apenas veículo (tampão citrato). Seguindo-se à injeção, os ratos foram mantidos em jejum adicional de 1 hora, a fim de evitar a competição da droga com as moléculas de glucose provenientes da dieta, aumentando as chances de ligação aos receptores GLUT nas células β pancreáticas. Três dias após a aplicação de STZ, a glicemia foi aferida por meio do glicosímetro Accu Check Active (Roche®), coletando-se pequeno volume de sangue periférico da cauda em fitas reativas. Ratos foram considerados diabéticos e mantidos no experimento quando a glicemia apresentada era igual ou maior que 250 mg/dl). Os tratamentos ou coleta de tecidos foram realizados em diferentes tempos após do diabetes. Ao fim dos experimentos, nova aferição da glicemia foi realizada para confirmação do estado diabético.

4.4 Medida da alodinia mecânica (Von Frey Eletrônico)

A alodinia mecânica foi avaliada por meio do teste de pressão crescente na pata de ratos, denominado de teste de Von Frey eletrônico, aplicado por um analgesímetro eletrônico (IITC Life Science, EUA). O aparelho possui um transdutor de força conectado a um contador digital de força, que registra em gramas (g) a pressão exercida na pata do animal. O contato do transdutor de força com a pata é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor.

Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5mm², constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento, para adaptação ao ambiente. Uma força linearmente crescente foi então aplicada, por entre as malhas da rede, no centro da planta da pata do rato até que o animal produzisse uma resposta de retirada e "sacudida" da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos até que o animal apresentasse três medidas similares com uma nítida resposta de "sacudida" após a retirada da pata. O limiar de retirada ao estímulo mecânico foi então quantificado e expresso em gramas, obtido através da média de três medidas, observado antes da administração de STZ (estado basal ou zero hora) e da média

1 de três valores em gramas, medidos em diferentes tempos após a indução do
2 diabetes ou após a administração das drogas em questão (avaliação 30, 60, 120,
3 180 e 240 e 300 min após a administração das drogas).

4

5 **4.5 Coleta de Tecidos**

6 Os tecidos (porção lombar da medula espinhal - segmentos L4 – L6 e nervo
7 ciático) de animais normoglicêmicos (Ngl) e diabéticos (Dbt) em diferentes tempos
8 após o início do estado diabético foram apropriadamente coletados após eutanásia
9 dos animais, e mantido sob refrigeração até o processamento para as técnicas de
10 HPLC, *western blotting*, imunofluorescência ou ELISA.

11

12 **4.6 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)**

13 Para a realização da análise dos níveis de serotonina (5HT – 5
14 hidroxitriptamina), assim como os níveis de seu metabólito, o ácido 5
15 hidroxindolacético (5-HIAA), amostras de cordão espinhal na região lombar foram
16 retiradas de animais pertencentes ao grupo Ngl e Dbt após 4 semanas. A
17 metodologia empregada foi semelhante à utilizada por Da Silva Dias et al., 2015,
18 com algumas adaptações: após a coleta, as amostras foram pesadas e
19 homogeneizadas por meio de sonicação em 500 mL de solução de extração
20 (composta de 0,1 M ácido perclórico contendo 0,4mM de metabisulfito de sódio e 0,2
21 mM de ácido etilenodiaminotetraacético), centrifugado a 20.000 g durante 10
22 minutos a 06°C, filtrado em membrana (poro de 0,22 mm) e estocado em freezer -
23 80°C para análise. Após quantificação de proteínas por meio do método de ácido
24 bicinconínico (Pierce Chemicla, Rockfor, IL), os sobrenadantes foram submetidos à
25 separação isocrática por meio de sistema de coluna de C18 de fase reversa (Perkin
26 Elmer Brownlee Columns, Shelton, CT) e eletroquimicamente detectada usando
27 detector amperométrico (L-ECD-6A, Shimadzu, Japan). O potencial foi determinado
28 a 850 mV (em comparação a um eletrodo de referência de Ag/AgCl). A fase
29 móvel consistiu de ácido cítrico 0,163 M, fosfato de sódio dibásico anidro 0,06 M,
30 sulfato de sódio octila, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 12 mM, acetonitrila
31 4%, tetrahidrofurano 1,7 %, e ácido ortofosfórico suficiente para tornar o pH 2,85,
32 diluído em água duplamente destilada. A fase móvel foi filtrada em uma membrana

1 de 0.2 mm, degaseificado sob vácuo, e injetado a uma taxa de fluxo de 1,2 mL/min
2 (HITACHI Pump System L-7100). Cada amostra foi analisada em duplicata para as
3 concentrações de 5-HT e 5- HIAA. A adição de dihidroxibenzilamina (DHBA) aos
4 extratos dos grupos Ngl e Dbt serviu como padrão de controle interno. A
5 recuperação dos analitos foi determinada pela adição de uma concentração fixa do
6 padrão interno (DHBA) após a homogeneização dos tecidos. Todas as substâncias
7 foram quantificadas pela comparação das áreas de picos em relação às curvas
8 padrão.

9

10 **4.7 Análise a expressão de proteínas por *Western Blotting***

11 Após coleta do segmento lombar do cordão espinhal em tampão RIPA
12 Buffer® (Sigma Aldrich) com inibidores de proteases, as amostras foram
13 processadas com homogeneizador Dremel 10.8 V Lithium-íon/com ponteira de
14 acrílico. O homogenato foi centrifugado a 13000 g (15 min) a 4°C. Uma alíquota do
15 sobrenadante foi separada para dosagem de proteínas pelo método colorimétrico
16 Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL EUA), utilizando-se
17 curva quadrática de albumina como padrão de comparação.

18 Após dosagem da concentração e proteína total, alíquotas correspondentes a
19 100 µg de proteína foram incubadas com tampão de amostra na proporção (1:1), a
20 99° C por 10 minutos em termociclador Eppendorf ThermoStat Plus (Hauppauge,
21 EUA). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% (1,5
22 mm de espessura) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS; SDS-PAGE) para
23 separação por eletroforese, utilizando-se o sistema Mini-Protean II Eletrophoresis
24 Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). A corrida foi feita sob voltagem
25 inicial de 80 V, durante 30 minutos, a qual foi aumentada para 100 V, por 1 hora.

26 Após a separação das proteínas, o gel e a membrana de nitrocelulose foram
27 incubadas em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM,
28 20% de metanol) por 10 min. A transferência para membranas de nitrocelulose 0,2
29 µm (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK), foi realizada utilizando-se o
30 sistema de transferência Mini-Trans Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA,
31 USA). A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 07 –
32 30 minutos, dependendo do peso molecular da proteína alvo. Foi realizada a
33 coloração com Ponceau 0,5% e ácido tricloroacético 3%, para certificação de que

1 houve transferência das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas em
2 solução tampão salina tris- tween (TBST) e o bloqueio dos sítios antigênicos
3 inespecíficos foi realizado pela incubação das membranas por 12 horas sob
4 refrigeração, em solução tampão salina tris (TBS) contendo 5% (p/v) de leite
5 desnatado sob agitação contínua.

6 Após bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TBST por 5 min.
7 Em seguida foram incubadas em solução TBS contendo leite desnatado a 5% (p/v),
8 onde será adicionado anticorpo policlonal de coelho IDO (E-7; 1:500; Santa Cruz
9 Biotechnology, Santa Cruz, California, EUA); ou anticorpo policlonal de cobaia contra
10 KMO (1:1000, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA); ou anticorpo policlonal
11 mouse contra GFAP (1:10000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California,
12 EUA); anticorpo policlonal de coelho anti IBA-1 (1:1000, Wako Chemicals,
13 Richmond, VA, EUA) ou anticorpo policlonal de coelho anti GAPDH (1:10000,
14 Abcam, Cambridge, MA, EUA). À exceção do anticorpo para GAPDH, todas as
15 demais conjugações com anticorpo foram realizadas *overnight* sob temperatura
16 refrigerada (2°C – 8°C). Para o anticorpo primário do GAPDH, a reação foi mantida
17 por 1 hora, à temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, as
18 membranas foram lavadas 3 vezes (5 min) com TBST e em seguida incubadas com
19 anticorpo IgG com antigenicidade contra o produtor do anticorpo primário (Jackson
20 ImmunoResearch, PA, EUA), durante uma hora (temperatura ambiente). Após a
21 retirada do anticorpo secundário, as membranas serão novamente lavadas com
22 TBST.

23 Para revelar as membranas, estas foram incubadas com uma mistura de
24 reagentes do kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little
25 Chalfont, UK) como descrito no manual de instruções e levadas ao aparelho (Chemi
26 Doc MP System, BioRad, Hercules, CA, EUA) por aproximadamente 30 min.

27

28 **4.8 Quantificação de citocinas pelo método de ELISA**

29 Após os tempos determinados, amostras de nervo ciático e medula espinhal
30 (porção lombar) foram coletadas em tampão PBS e processadas por maceração. As
31 amostras foram centrifugadas a 10000 rpm (10 min) a 4 °C e o sobrenadante foi
32 utilizado para avaliar os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF α) pelo método
33 imunoenzimático (ELISA). Em resumo, placas de 96 poços foram cobertas com 50

1 μL /poço do anticorpo específico contra a proteína de interesse (Pharmigen, San
2 Diego, CA, USA.). O anticorpo foi diluído em solução de ligação pH 9,0 e incubados
3 por 18 - 24 horas, a 4 °C. As placas foram então lavadas por três vezes com
4 PBS/Tween-20 (0,05% Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com
5 100 μL de PBS/BSA 1% por 120 min, em temperatura ambiente. As amostras e o
6 padrão (curva padrão) contendo as concentrações para as citocinas foram colocados
7 nas placas (50 μL) e incubados por 18 - 24 horas a 4°C. Após esse período, as
8 placas foram novamente lavadas com TPBS e 50 μL dos anticorpos biotinilados
9 específicos contra IL-1 β (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IL-6 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e TNF- α (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizando-se
10 o kit Duo Set (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Após uma hora, as placas
11 foram lavadas com TPBS e o conjugado avidina-peroxidase, na diluição de 1:5000,
12 adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação, as placas foram novamente
13 lavadas com PBS/Tween e incubadas com 100 μL do substrato OPD (o-
14 fenilenediaminadihidrocloreto; Sigma) por 15 a 20 min em temperatura ambiente. A
15 reação foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 (1M) e a densidade óptica medida a
16 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados
17 foram expressos em picogramas/ mg de proteína.

18

19 **4.9 Imunofluorescência**

20 Após coleta, a porção lombar do cordão espinhal foi crioprotégida em solução
21 de sacarose 30%, tendo sido posteriormente incluída em Tissue-Tek OCT (Sakura
22 Finetek, Torrance, CA, EUA) e congelada em nitrogênio líquido. Em aparelho
23 criostato, foram realizados cortes de 20 μm de espessura, coletados em lâmina
24 gelatinizada. Após fixação em metanol gelado durante 5-8 minutos e 2 lavagens com
25 PBS por 5 minutos, os cortes foram preparados com glicina 0,1M (diluída em PBS)
26 durante 30 minutos.

27 Após o preparo com glicina, os cortes tiveram seus sítios antigênicos
28 bloqueados com uma solução contendo PBS + BSA 2% e Triton x100 0,2%, por 30
29 minutos. As lâminas contendo os cortes foram, então, incubadas em local protegido
30 de iluminação com anticorpo primário camundongo anti IDO1 (1:500; Santa Cruz
31 Biotechnology, Santa Cruz, California, EUA) ou coelho anti GFAP (1:1500, anticorpo
32 conjugado com fluoróforo, Abcam, Cambridge, MA, EUA) por 12 horas, à
33 temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS, os cortes

1 foram incubados com anticorpo secundário coelho anti camundongo conjugado com
2 Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, MO, EUA) por 12 horas, apenas no
3 caso das lâminas com marcação para IDO, uma vez que o marcador para GFAP já
4 apresenta conjugação ao fluoróforo. Seguiu-se a montagem da lâmina com
5 Fluoromont (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e análise em microscópio confocal
6 de fluorescência Leica DMI600B (Wetzlar, Alemanha).

7

8 **4.10 Análise estatística**

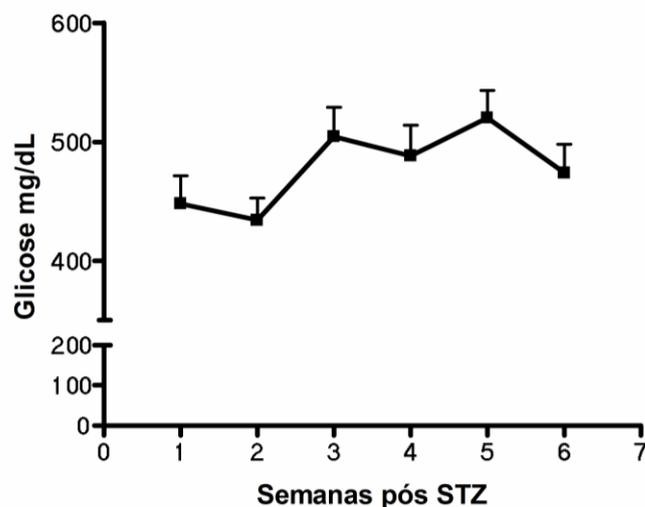
9 Os dados estão representados como média \pm erro padrão das médias de 6 a
10 8 animais por grupo. Os dados referentes à alodinia mecânica e os decursos
11 temporais pós-tratamento foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) de
12 uma ou duas vias (One ou Two way-ANOVA) seguido de *post hoc* de Bonferroni.
13 Quando relativo a dois grupos somente (Figuras 5.2 e 5.3), a análise foi realizada
14 por teste t não pareado. Para todos os resultados, valores de $p \leq 0,05$ foram
15 considerados como estatisticamente significativos.

16

17 **5. RESULTADOS**

18 **5.1 Determinação de estado hiperglicêmico em animais após a** 19 **administração de STZ.**

20 O grupo de animais submetidos à administração sistêmica de estreptozotocina
21 (STZ) apresentaram aumento significativo dos níveis séricos de glicose, quando
22 comparada à glicemia prévia ao processo de diabetização (dados não mostrados).
23 Assim, assume-se que o grupo de animais submetidos à diabetização apresentam
24 glicemia superior ao limiar estabelecido para a determinação do quadro diabético
25 (Fig 5.1). O aumento da glicemia é contínuo por até 6 semanas após a injeção de
26 STZ, demonstrando a característica persistente do quadro e das alterações
27 fisiológicas e a nível celular que tal aumento pode promover.



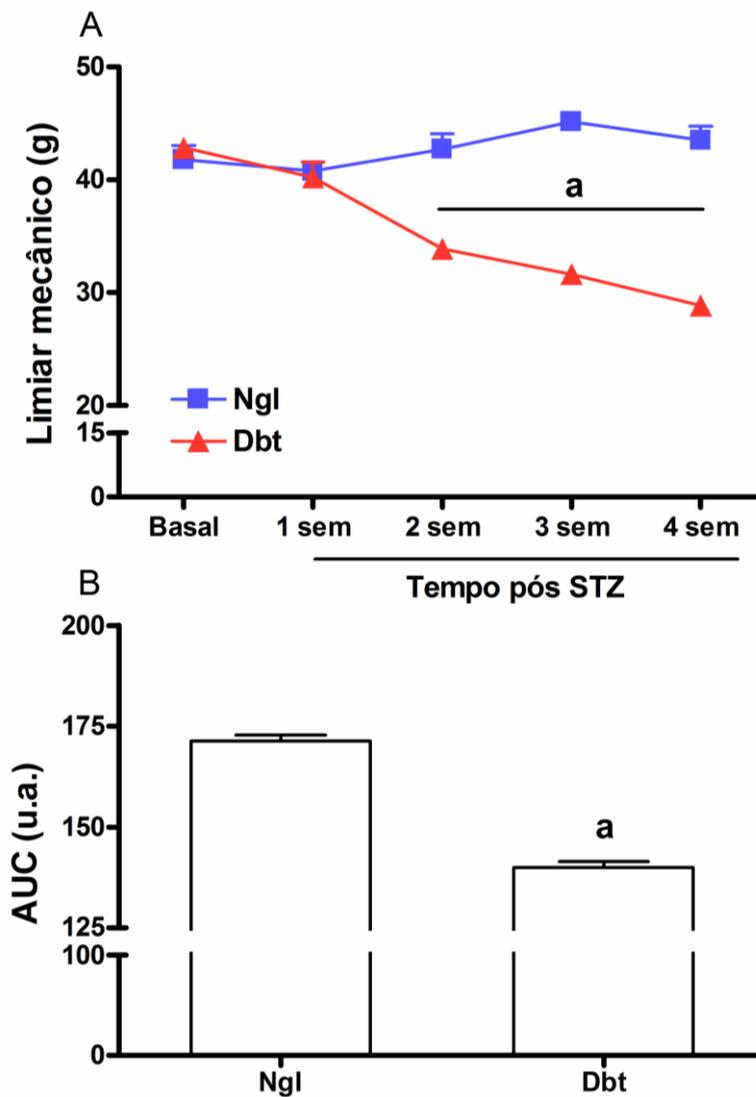
1 Fig 5.1 – Glicemia de animais submetidos à administração de STZ , formando o grupo
 2 diabético (n=13). Nota-se que os valores de glicemia tornam-se superiores ao limiar para serem
 3 considerados como diabéticos (250 mg/dL) a partir da 1ª semana após a indução, permanecendo
 4 neste estado durante as semanas subsequentes.

5

6 **5.2 Decurso temporal do limiar mecânico de animais normoglicêmicos e** 7 **diabéticos.**

8 Os animais foram inicialmente submetidos à avaliação quanto ao limiar
 9 mecânico (medida basal). Após esta aferição, um grupo de animais foi submetido à
 10 administração de STZ (animais diabéticos, Dbt), ao passo que os demais receberam
 11 apenas o veículo de dissolução da droga, citrato de sódio (animais normoglicêmicos,
 12 Ngl). Semanalmente, foi realizada a mensuração do limiar mecânico de ambos os
 13 grupos, Ngl e Dbt.

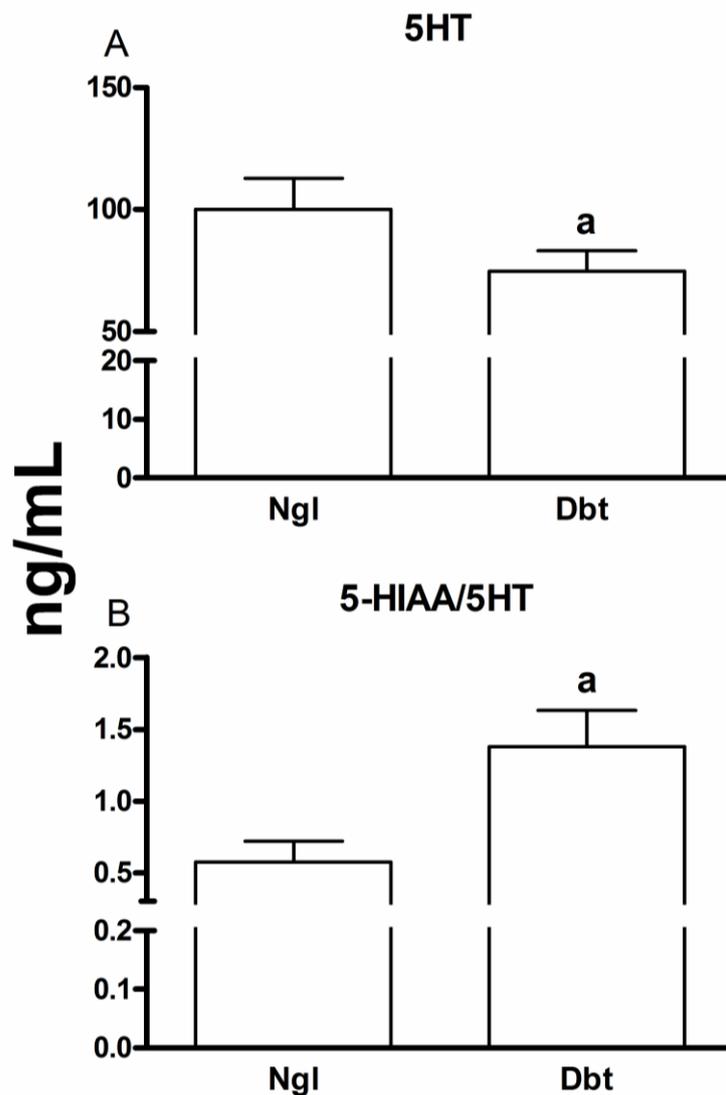
14 Como demonstra a figura Fig 5.2 (painel A), animais Dbt apresentaram queda
 15 no limiar mecânico a partir da 2ª semana pós indução, caracterizando a alodinia
 16 mecânica, persistente ao menos até a 5ª semana pós-administração de STZ (dados
 17 não mostrados), quando comparados ao grupo Ngl, os quais não apresentaram
 18 alterações no limiar mecânico ao longo do tempo (se comparados aos limiar
 19 mecânico prévio à administração de tampão citrato). O pico da alodinia mecânica no
 20 grupo Dbt foi na 4ª semana pós diabetização (Painel A), havendo redução de 20%
 21 em média no limiar mecânico (Painel B) quando comparado aos animais Ngl.
 22 Quando analisado por área sob a curva, os animais Dbt exibiram significativa
 23 redução da área sob a curva quando comparado ao grupo Ngl (Fig. 5.1, painel B).



1 Fig.5.2 – Alterações no limiar de retirada à estímulo mecânico em animais diabéticos (Dbt;
 2 n=8) e normoglicêmicos (Ngl; n= 7). Painel A: Decurso temporal do limiar de retirada à estímulo
 3 mecânico entre os dois grupos. Painel B: Análise da área sob a curva (AUC, em unidades arbitrárias,
 4 u.a.) calculada desde a medida basal (antes da administração de tampão citrato- Ngl ou
 5 estreptozotocina- Dbt) até a 4ª. semana após este tratamentos. a denota que $p < 0,05$ quando
 6 comparados em diferentes tempos, após análise por Two-way ANOVA entre os grupos, ou por teste t
 7 de Student quando comparada a AUC entre os grupos.

1 **5.3 Redução dos níveis de serotonina e da taxa de renovação de**
 2 **serotonina em animais diabéticos.**

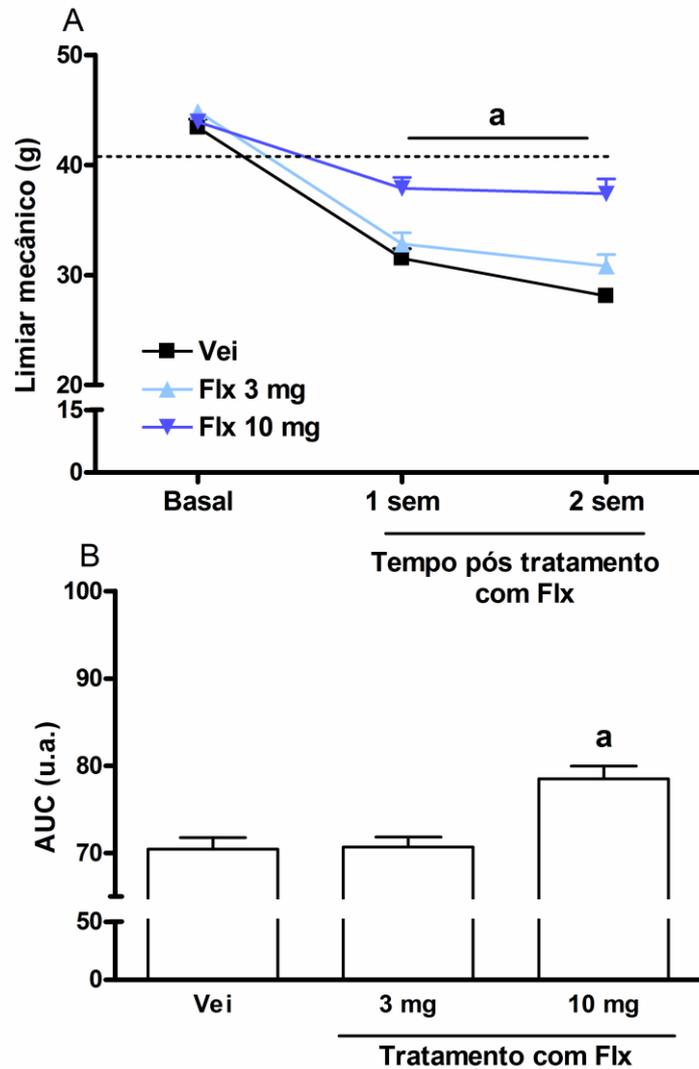
3 Quando comparados ao grupo Ngl, animais Dbt apresentaram menores níveis
 4 de serotonina em amostras de cordão espinhal (Fig 5.3, Painel A). Além disso, a
 5 razão dos níveis de seu metabólito 5HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético)/ serotonina
 6 apresentou-se significativamente maior nos animais diabéticos, sugerindo uma
 7 redução da taxa de renovação de serotonina (Fig 5.3, Painel B).



8 Fig 5.3 Avaliação dos níveis de serotonina (5-HT; painel A) e da razão do seu metabólito
 9 ácido 5-hidroxiindolacético metabólito (5-HIAA)/ 5-HT (painel B) em amostra da porção lumbar de
 10 cordão espinhal de animais normoglicêmicos (Ngl; n=6) e diabéticos (Dbt; 4 semanas do início do
 11 quadro diabético; n=7). * denota que p=0.05 após análise por teste t de Student.

1 **5.4 Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina sobre a alodinia**
2 **mecânica em animais diabéticos.**

3 Após a segunda semana da indução ao estado diabético, os animais Dbt
4 receberam diariamente tratamento com diferentes doses do inibidor da recaptção
5 de serotonina fluoxetina (Flx) intraperitonealmente (i.p.). Com pode ser observado na
6 Fig 5.4 (painel A), o tratamento com Flx somente na dose de 10 mg/Kg (mas não na
7 dose de 3 mg/Kg) induziu significativo efeito antinociceptivo nos animais Dbt quando
8 avaliados os limiares de retirada ao estímulo mecânico 7 e 14 dias após o início do
9 tratamento. Como observado previamente, os animais Dbt apresentaram alodinia
10 mecânica iniciada na 2ª semana após a indução ao quadro diabético, quadro que
11 persiste até a 4ª semana após a administração com STZ. Similarmente, pela análise
12 de área sob a curva (AUC, Fig 5.4, painel B) é possível observar antinocicepção no
13 grupo tratado com a dose de 10 mg/Kg. Doses adicionais (15 e 20 mg/Kg) foram
14 iniciadas, entretanto, causaram intenso efeito sobre a condição geral de saúde dos
15 animais, inviabilizando a continuação dos tratamentos.



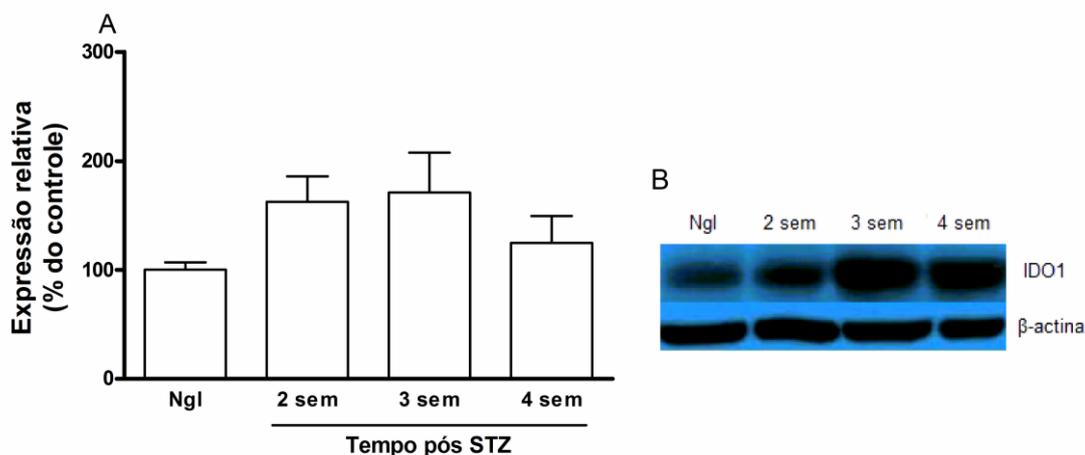
1 Fig 5.4 – Efeito do tratamento sub crônico (14 dias) com inibidor de recaptção de serotonina
 2 (fluoxetina) nas doses de 3 (n=8) e 10 mg/Kg (n=11), sobre a alodinia mecânica em animais
 3 diabéticos. Painel A: decurso temporal dos grupos Dbt que receberam veículo (Vei; n=7) ou fluoxetina
 4 (Flx) após a segunda semana pós diabetização. A linha tracejada indica o limiar médio do grupo Ngl
 5 para efeitos comparativos. Painel B: Análise da área sob a curva (AUC, em unidades arbitrárias, u.a.)
 6 da resposta comportamental avaliada desde a medida basal até a 2ª. semana após o tratamentos
 7 com veículo (Vei) ou Flx (3 ou 10 mg/Kg). a denota que houve diferença no grupo Flx 10 mg frente
 8 ao grupo Vei após análise de Two-way ANOVA no decurso temporal ou One-way ANOVA quando
 9 analisada a AUC dos grupos tratados em relação ao grupo Vei.

10

11 5.5 Expressão da enzima IDO1 (indolamina 2,3-dioxigenase) em porção 12 lombar de medula espinhal de animais Ngl e Dbt.

13 A expressão da IDO1 foi avaliada em amostras de cordão espinhal (porção
 14 lombar) de animais Ngl e diabéticos em diferentes tempos após a indução do
 15 diabetes experimental. Como demonstrado na Fig 5.5 (painel A), não houve

- 1 diferença quanto a expressão de IDO1 em animais Dbt nos diferentes tempos após a
 2 administração de STZ quando comparados aos animais Ngl ($p > 0,05$).

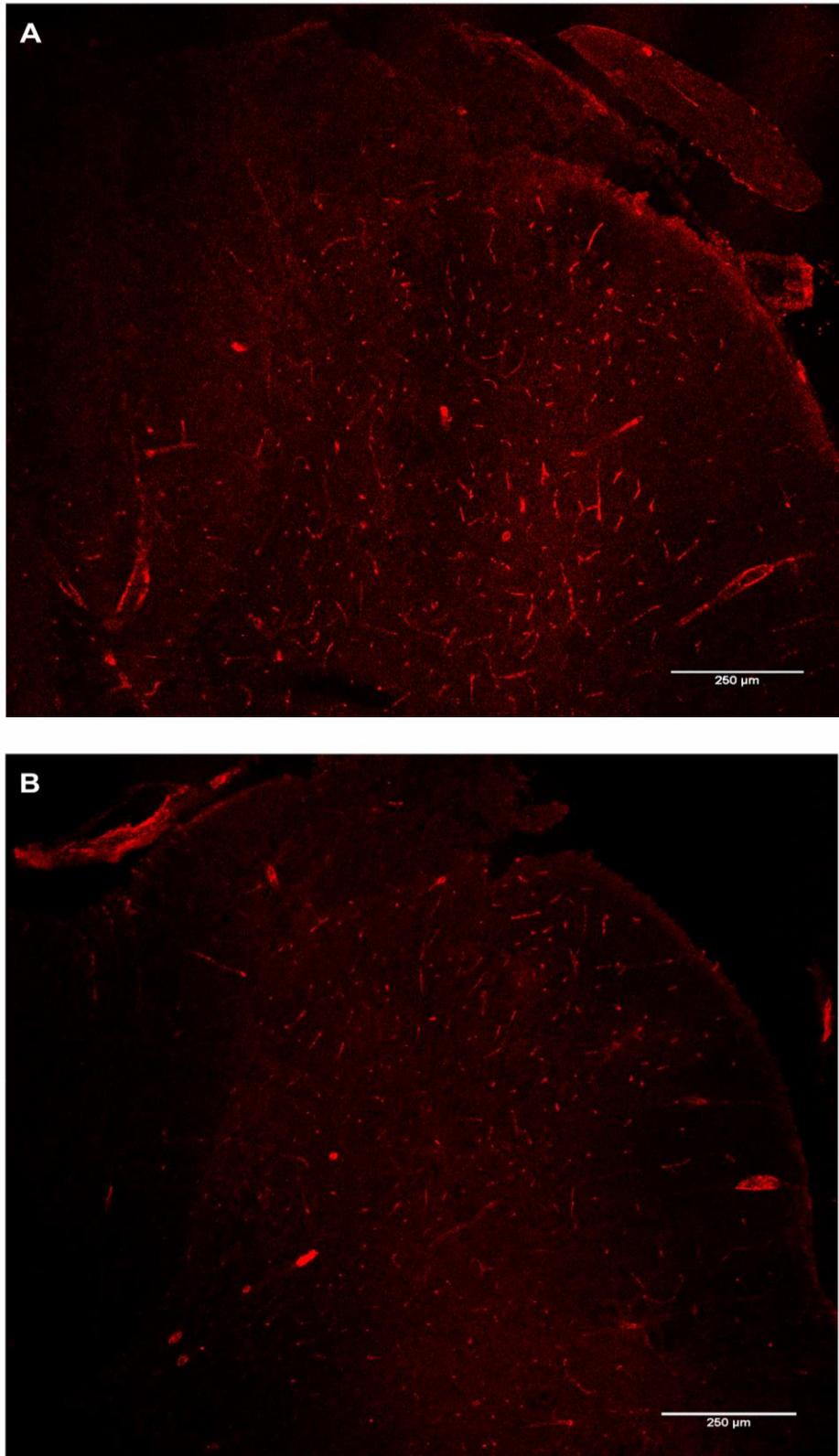


- 3 Fig 5.5 – Expressão relativa de IDO (indolamina 2,3-dioxigenase) em amostras de porção
 4 lombar de cordão espinal de animais normoglicêmicos (Ngl; n=5) ou diabéticos (Dbt) em diferentes
 5 tempos após a administração de estreptozotocina (STZ; 2 sem [n=5]; 3 sem [n=4]; 4 sem [n=4], painel
 6 A). Painel B: Imagens representativas da expressão de IDO1 e do controle endógeno β-actina.

7

8 **5.6 Imunofluorescência para a enzima IDO1 em porção lombar de cordão** 9 **espinal de animais normoglicêmicos e diabéticos.**

- 10 Através de imunofluorescência, foi analisada qualitativamente a presença da
 11 enzima IDO1 em amostras de porção lombar do cordão espinal de animais Ngl (Fig
 12 5.6, painel A) e Dbt 4 semanas após o início do diabetes (Fig 5.6, painel B), para
 13 complementar o resultado obtido com a técnica de *western blot* (Fig. 5.5, painéis A e
 14 B). Como pode ser observado na figura 5.6, a expressão da enzima não é restrita a
 15 uma determinada lâmina de Rexed, além de possuir padrão de distribuição
 16 semelhante entre os grupos, corroborando os dados obtidos previamente pela
 17 técnica de *western blot*.

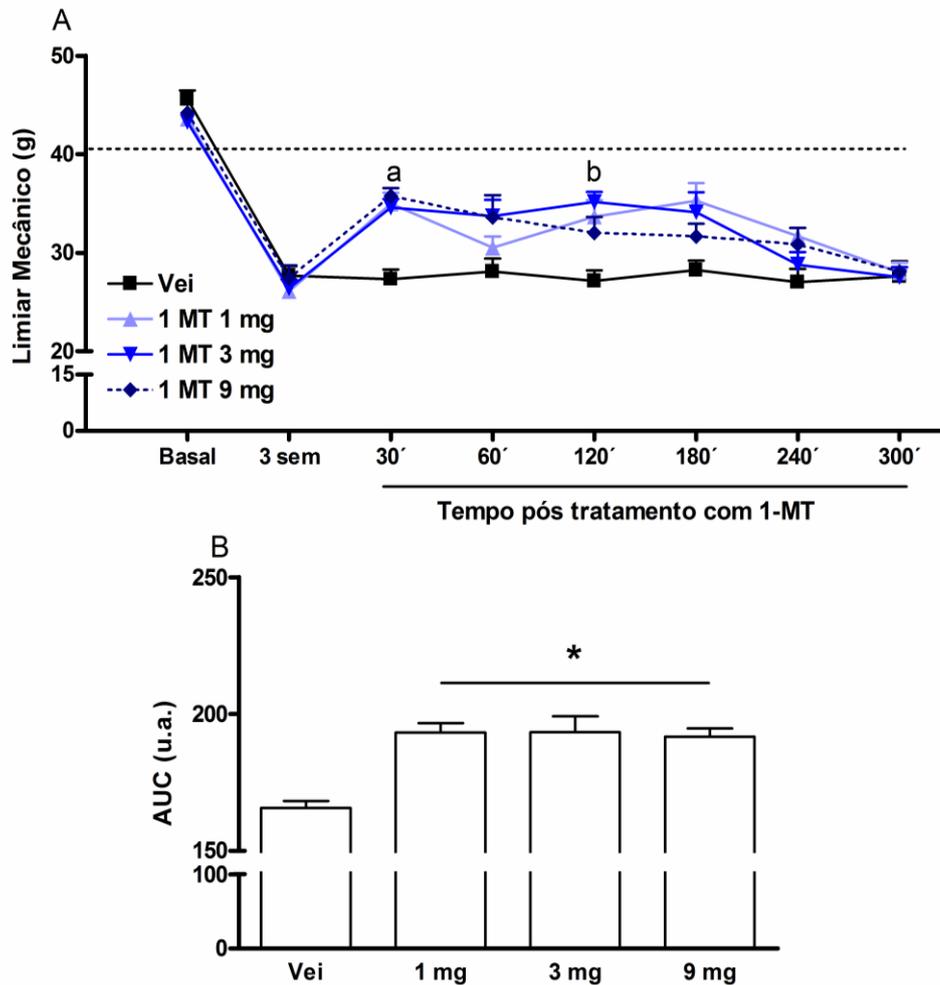


1 Fig. 5.6 – Imagens representativas da imunofluorescência para a enzima IDO1 (indolamina
2 2,3-dioxigenase) em porção lombar do cordão espinhal dorsal de animal do grupo normoglicêmico
3 (Ngl; painel A) ou diabético (Dbt; 4 semanas após a indução do diabetes; painel B) (Aumento de 20X).
4

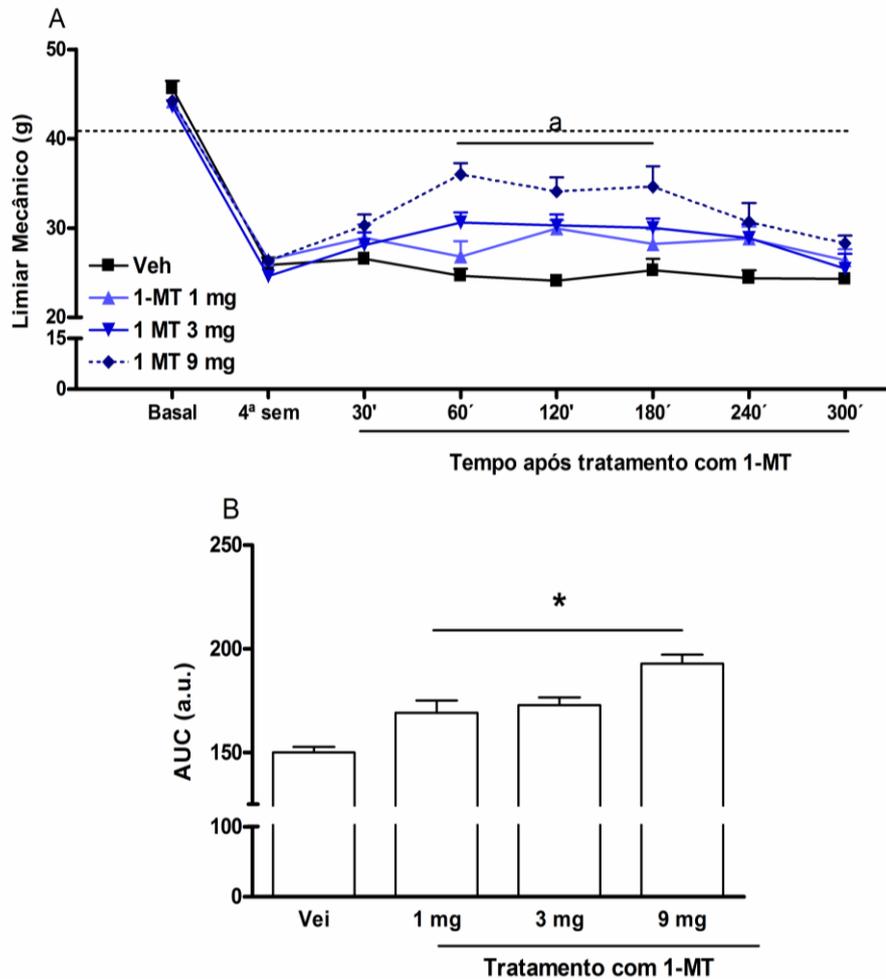
5.7 Efeito do tratamento agudo com inibidor da IDO, 1-L-metil triptofano sobre a alodinia mecânica em animais diabéticos.

Assim como observado previamente, o limiar mecânico nos animais diabéticos decai significativamente em relação aos animais normoglicêmicos a partir da segunda semana, representando o quadro de alodinia mecânica. Para o tratamento com o 1-L-MT, inibidor da IDO, foram escolhidos dois tempos de interferência diferentes (na terceira semana, em que observamos uma maior tendência ao aumento de expressão da IDO1, e na quarta semana, tempo do pico da queda do limiar mecânico). Como demonstra a Fig. 5.7 (painel A), o tratamento sistêmico com as doses de 1 e 3 mg/Kg apresentou efeito antinociceptivo, na primeira meia hora e na 2ª hora (120 min) após a administração de 1-MT, respectivamente, quando comparados ao grupo diabético controle (tratado apenas com veículo do 1-MT). No entanto, quando os dados foram analisados como AUC (Fig. 5.7. painel B) todas as doses de 1-MT demonstraram-se efetivas em relação ao veículo.

Quando o tratamento foi realizado na quarta semana após a indução do diabetes, somente a maior dose de 1-MT (9 mg/Kg) apresentou efeito antinociceptivo desde a primeira (60 min pós administração) até a 3ª hora (180 minutos pós administração), quando comparados ao grupo diabético controle que recebeu apenas o veículo de diluição do 1-MT (grupo Veh; Fig. 5.8 Painel A). Novamente, quando analisados como AUC, todos os grupos experimentais tratados com 1-MT (doses de 1, 3 ou 9 mg/Kg) mostraram-se significativamente diferentes do grupo Dbt controle (tratado com o veículo, Fig. 5.8 Painel B).



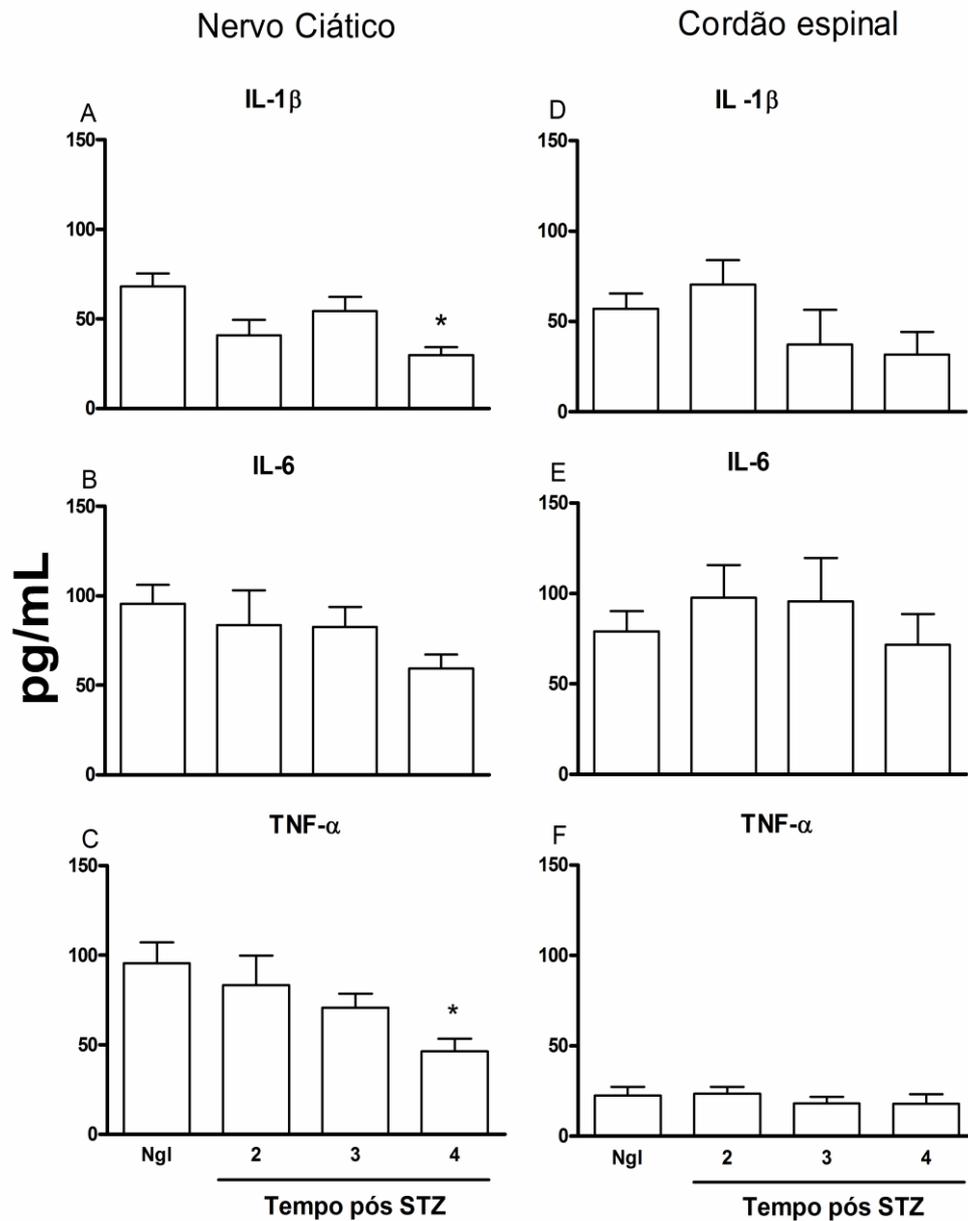
1 Fig. 5.7 – Atividade antinociceptiva induzida pelo tratamento com o inibidor da enzima IDO 1-MT,
 2 administrado em animais diabéticos, 3 semanas após a indução do diabetes. Painel A: Curva
 3 temporal do efeito do tratamento com 1-MT (doses de 1, 3 ou 9 mg/Kg, i.p.). As medidas do limiar de
 4 retirada ao estímulo mecânico foram realizadas antes do tratamento com estreptozotocina (Basal), na
 5 terceira semana após (3 sem) e em diferentes tempos após o tratamento com veículo (Vei) ou 1-MT.
 6 A linha tracejada indica o limiar mecânico médio de animais normoglicêmicos para comparação.
 7 Painel B: Análise da área soba curva (AUC, em unidades arbitrárias, u.a.) da resposta
 8 comportamental avaliada desde a medida basal até a 5^a. hora após os tratamentos com veículo (Vei;
 9 n=6) ou 1-MT (1 [n=10], 3 [n=8] ou 9 [n=5] mg/Kg). a denota que $p < 0.05$ quando comparado o grupo
 10 1 mg/Kg em relação ao grupo Vei; b denota que $p < 0,05$ quando comparado o grupo 3 mg em relação
 11 ao grupo Vei, após análise por Two-way ANOVA. * denota que todos os grupos indicados possuem
 12 $p < 0,05$ em relação ao grupo Vei, após análise de One-way ANOVA.



1 Fig. 5.8 – Atividade antinociceptiva induzida pelo tratamento com o inibidor da enzima IDO 1-MT,
 2 administrado em animais diabéticos, 4 semanas após a indução do diabetes. Painel A: Curva
 3 temporal do efeito do tratamento com 1-MT (doses de 1, 3 ou 9 mg/Kg, i.p.). As medidas do limiar de
 4 retirada ao estímulo mecânico foram realizadas antes do tratamento com estreptozotocina (Basal), na
 5 quarta semana após (4ª. sem) e em diferentes tempos após o tratamento com veículo (Vei [n=6]) ou
 6 1-MT. A linha tracejada indica o limiar mecânico médio de animais normoglicêmicos para
 7 comparação. Painel B: Análise da área sob a curva (AUC; em unidades arbitrárias, u.a.) da resposta
 8 comportamental avaliada desde a medida basal até a 5ª. hora após os tratamentos com Vei) ou 1-MT
 9 (1 [n=8], 3 [n=8] ou 9 [n=5] mg/Kg). a denota que $p < 0,05$ quando comparados o grupo 9 mg/Kg ao
 10 grupo Vei, após análise de Two-way ANOVA. * denota que $p < 0,05$, quando comparado qualquer um
 11 dos grupos tratados ao grupo Vei após análise de One-way ANOVA.

1 **5.8 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em**
2 **porção lombar do cordão espinhal e nervo ciático de animais diabéticos e**
3 **normoglicêmicos.**

4 Foi realizada a dosagem de diferentes citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6
5 e TNF- α) em tecido nervoso (cordão espinhal, porção lombar) e periférico (nervo
6 ciático) de animais Ngl e Dbt em diferentes tempos após a administração de STZ (2,
7 3 e 4 semanas). Como demonstra a Fig. 5.9 (painéis A e C), os animais diabéticos
8 por 4 semanas apresentaram significativa redução nos níveis de IL-1 β e de TNF α
9 em animais, quando comparados ao grupo normoglicêmico (Ngl). Já na porção
10 lombar do cordão espinhal, não foram encontradas diferenças nos níveis destas
11 citocinas entre os grupos analisados (Fig. 5.9, painéis D, E e F, $p>0,05$).



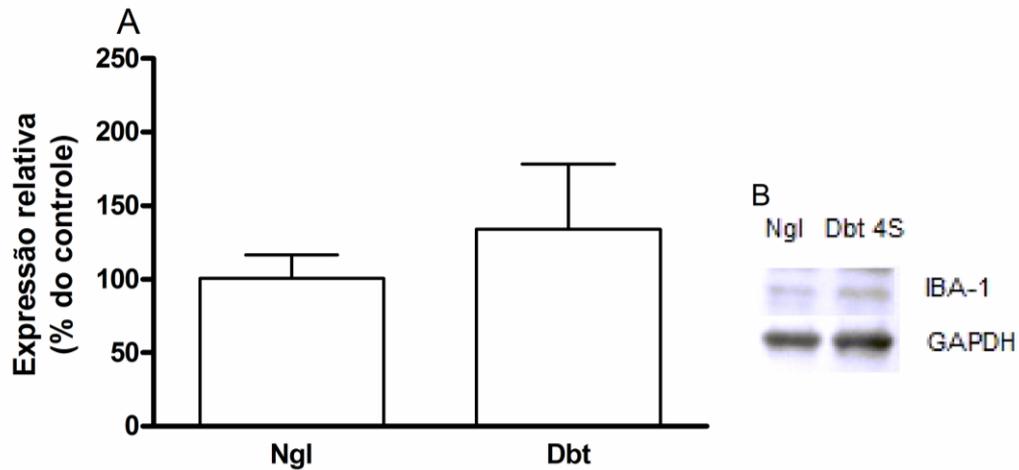
1 Fig. 5.9 – Dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) no nervo ciático (Painéis A, B e
 2 C) e cordão espinhal (Painéis D, E e F) de animais normoglicêmicos (Ngl; n=9) ou diabéticos (Dbt) em
 3 diferentes tempos (2 [n=5], 3 [n=8] ou 4 [n=9] semanas) após a indução do quadro hiperglicêmico. *
 4 denota que p<0,05 quando comparado ao grupo Ngl após análise de One-way ANOVA.

5

6 **5.9 - Expressão de proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (IBA-**
 7 **1) na porção lombar do cordão espinhal de animais normoglicêmicos e**
 8 **diabéticos.**

9 Como demonstrado na Fig. 5.10, a expressão relativa de IBA-1 na porção
 10 lombar da medula de animais diabéticos por 4 semanas não diferiu em relação aos

- 1 níveis observados em animais normoglicêmicos, sugerindo ausência de ativação
- 2 microglial diferencial neste animais.



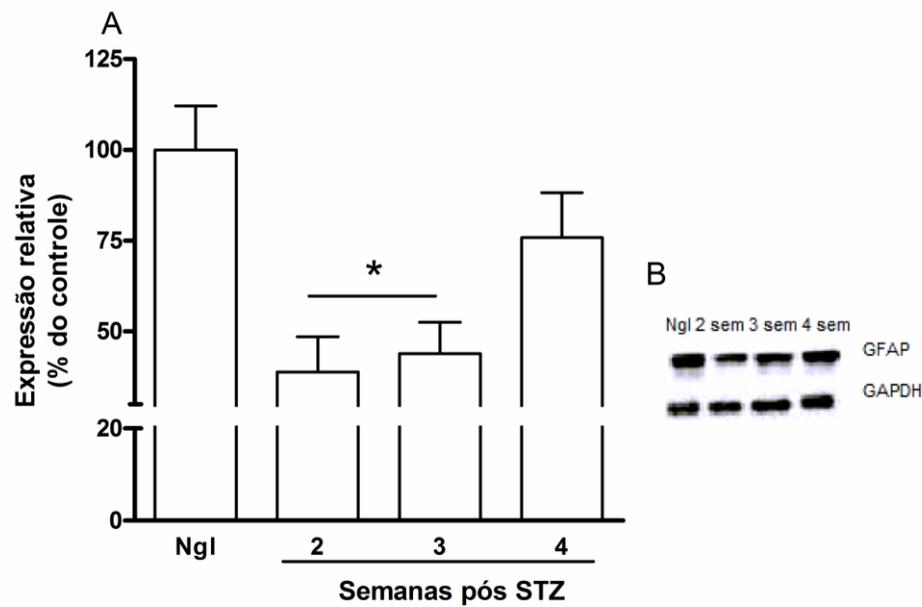
- 3 Fig. 5.10 – Expressão relativa de proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (IBA-1) na
- 4 porção lombar do cordão espinhal de animais normoglicêmicos (Ngl; n=4) ou diabéticos (Dbt) 4
- 5 semanas após a indução do quadro hiperglicêmico (painel A). Painel B: imagem representativa da
- 6 expressão de IBA-1 em tecidos da porção lombar do cordão espinhal de animais Ngl e Dbt pós 4
- 7 semanas (n=3). GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, proteína de referência.

8

9 **5.10 Expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em porção lombar**

10 **de cordão espinhal de animais normoglicêmicos e diabéticos**

- 11 A expressão do marcador de astrócitos, GFAP, foi analisada em porção
- 12 lombar de cordão espinhal de animais normoglicêmicos (Ngl) e diabéticos (Dbt) em
- 13 diferentes tempos após a indução do quadro hiperglicêmico. Como demonstra a Fig.
- 14 5.11, foi observado que a expressão relativa de GFAP foi significativamente reduzida
- 15 em animais diabéticos após 2 e 3 semanas do início do estado diabético ($p < 0,05$).

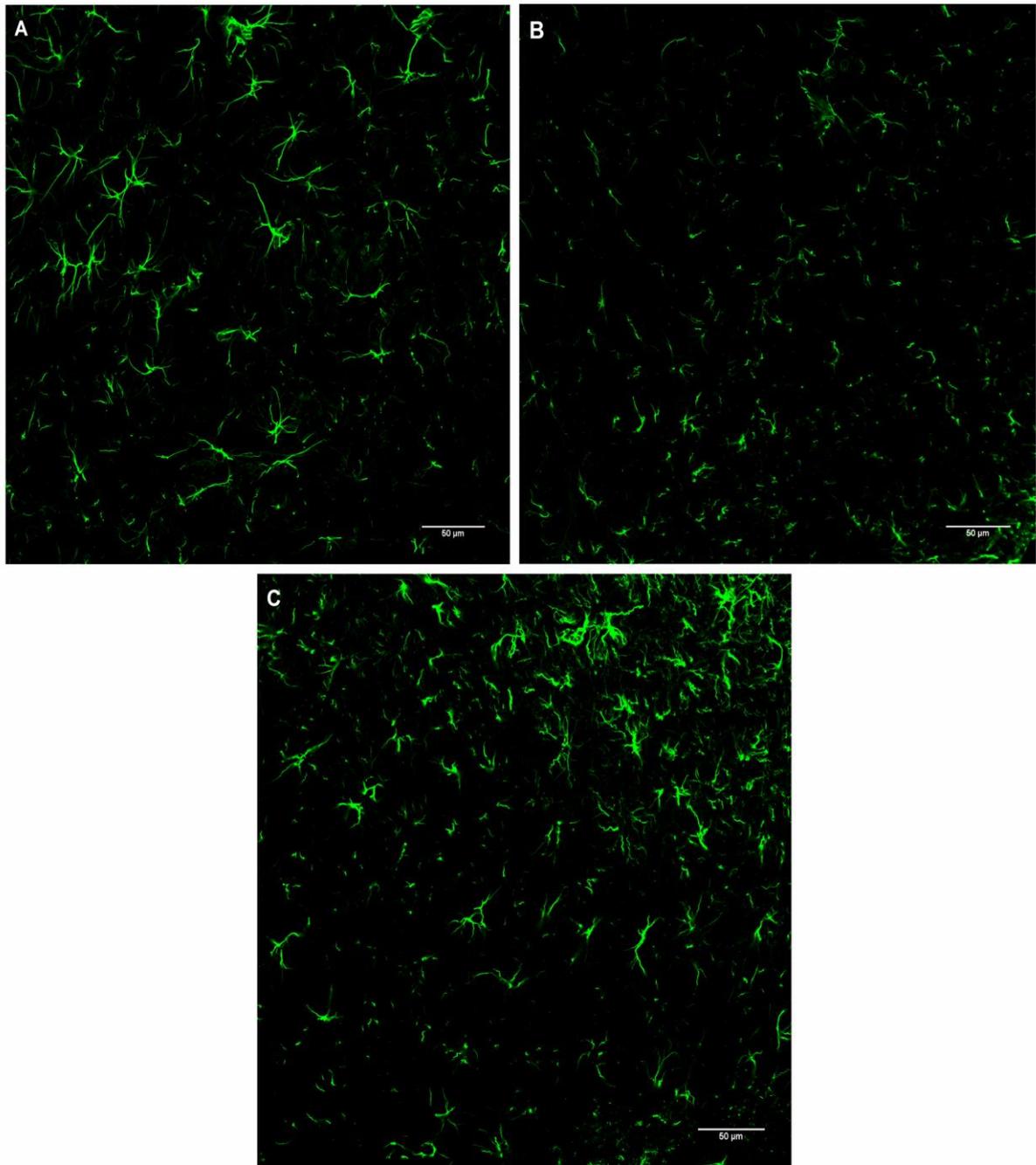


1 Fig. 5.11 – Expressão relativa de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em amostras de porção
 2 lombar da medula espinal de animais normoglicêmicos (Ngl; n= 7) ou diabéticos (Dbt) em diferentes
 3 tempos (2 [n= 4], 3 [n= 5] e 4 [n= 7] semanas) após a administração de estreptozotocina. Painel B:
 4 imagens representativas da expressão de GFAP nos diferentes grupos analisados. * denota que
 5 $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Ngl após análise de One-way ANOVA. GAPDH: gliceraldeído-3-
 6 fosfato desidrogenase, proteína de referência.

7

8 **5.11 Análise da distribuição de GFAP em porção lombar de cordão**
 9 **espinal de animais normoglicêmicos (Ngl) ou diabéticos (Dbt) através de**
 10 **imunofluorescência.**

11 Como demonstra a Fig. 5.12, os astrócitos dos animais Dbt apresentam
 12 mudanças morfológicas quando comparados aos animais Ngl, *i.e.* enquanto que os
 13 astrócitos de animais Ngl apresentam contorno mais espreado, estas células
 14 parecem ter um formato mais arredondado, com redução no número de ramificações
 15 nos animais diabéticos, sendo mais evidente após 3 semanas do estado
 16 hiperglicêmico. Na 4ª semana após a indução ao diabetes, percebe-se que o formato
 17 das células tende a assemelhar-se ao grupo Ngl, embora as ramificações das
 18 células não sejam tão evidentes como no grupo Ngl.

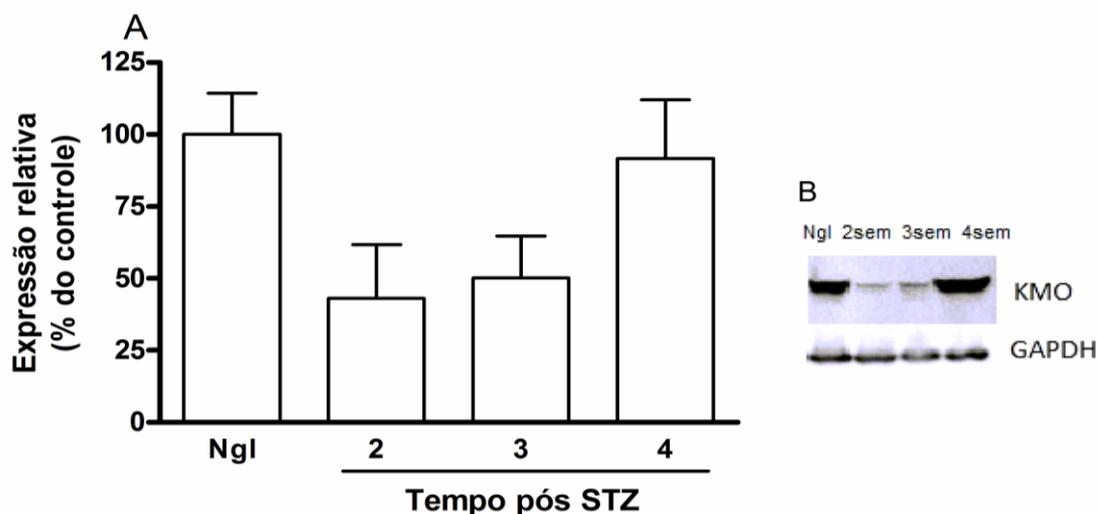


1 Fig. 5.12 – Distribuição de marcador para astrócitos (GFAP) em porção medular de animais
2 normoglicêmicos (Ngl, painel A) ou diabéticos (Dbt) por 3 (painel B) ou 4 semanas (painel C).

3

4 **5.12 Expressão da enzima quiniurenina 3-monooxigenase (KMO) em**
5 **porção lombar do cordão espinhal de animais normoglicêmicos eou**
6 **diabéticos.**

1 Como demonstra a Fig. 5.13, não foi observado diferença estatística quanto a
 2 expressão de KMO, enzima responsável pela formação de algumas quinureninas, na
 3 porção lombar do cordão espinhal dos diferentes grupos experimentais
 4 (normoglicêmicos ou diabéticos por 2, 3 ou 4 semanas), embora haja tendência
 5 ($p=0,07$) de redução na segunda e terceira semanas pós diabetização.



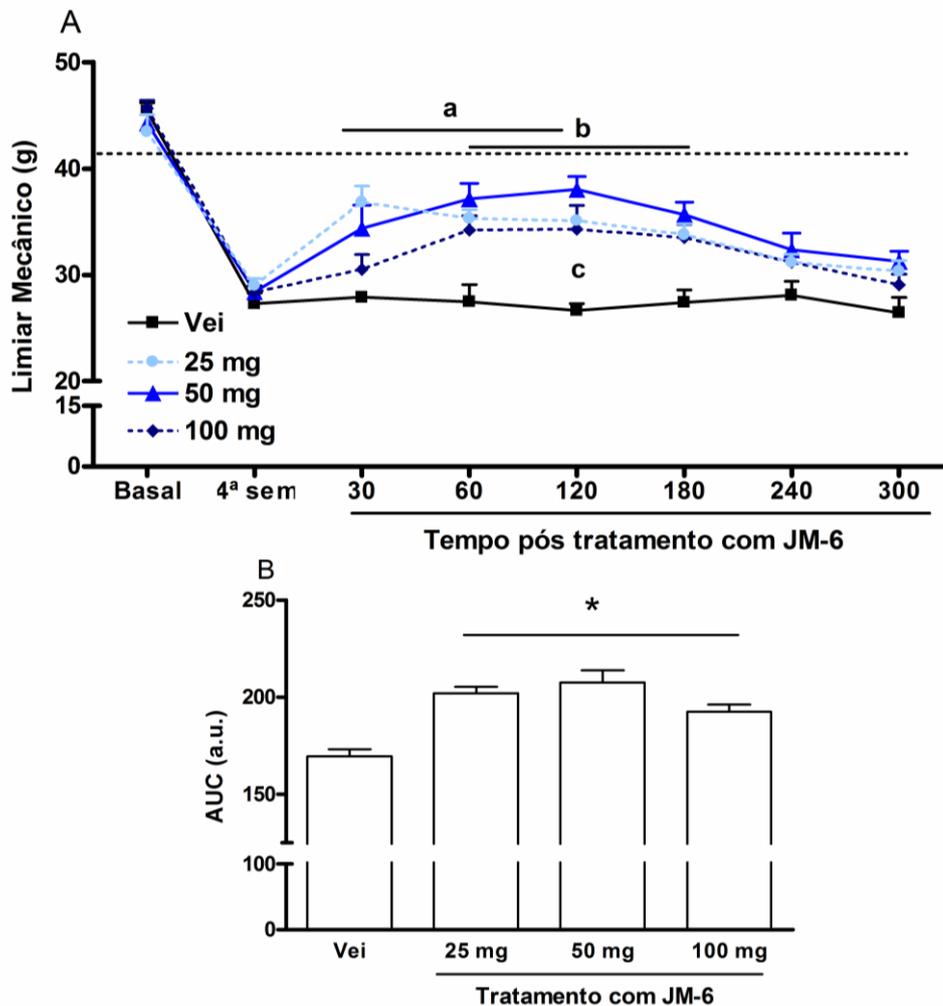
6 Fig. 5.13 – Expressão relativa da enzima quiniurenina 3-monooxigenase (KMO) em amostras
 7 da porção lombar do cordão espinhal de animais normoglicêmicos (Ngl; $n=4$) ou Dbt em diferentes
 8 tempos após a indução do diabetes (2 [$n=4$], 3 [$n=5$] ou 4 [$n=4$] semanas). Painel B: Imagem
 9 representativa da expressão de KMO em amostras da porção lombar do cordão espinhal de animais
 10 normoglicêmicos (Ngl) ou Dbt em diferentes tempos após a indução do diabetes (2, 3 ou 4 semanas).
 11 GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, proteína de referência.

12

13 **5.13 Efeito do tratamento agudo com inibidor da KMO, JM-6 sobre a** 14 **alodinia mecânica em animais diabéticos.**

15 A fim de verificar o efeito do bloqueio farmacológico da enzima KMO,
 16 diferentes doses de JM-6, uma pró-droga, foram sistemicamente administradas em
 17 animais após a 4^a semana do início do estado diabético, pico da alodinia mecânica.
 18 Como demonstra a Fig. 5.14 (painel A), o tratamento com JM-6 induziu efeito
 19 antinociceptivo durante a primeira meia hora (30 min) até a segunda hora (120 min)
 20 na menor dose (25 mg), efeito este observado também com o tratamento com a da
 21 dose intermediária (50 mg), durante a primeira até a terceira horas (60 até 180 min).
 22 A dose maior promoveu efeito antinociceptivo apenas durante a segunda hora após

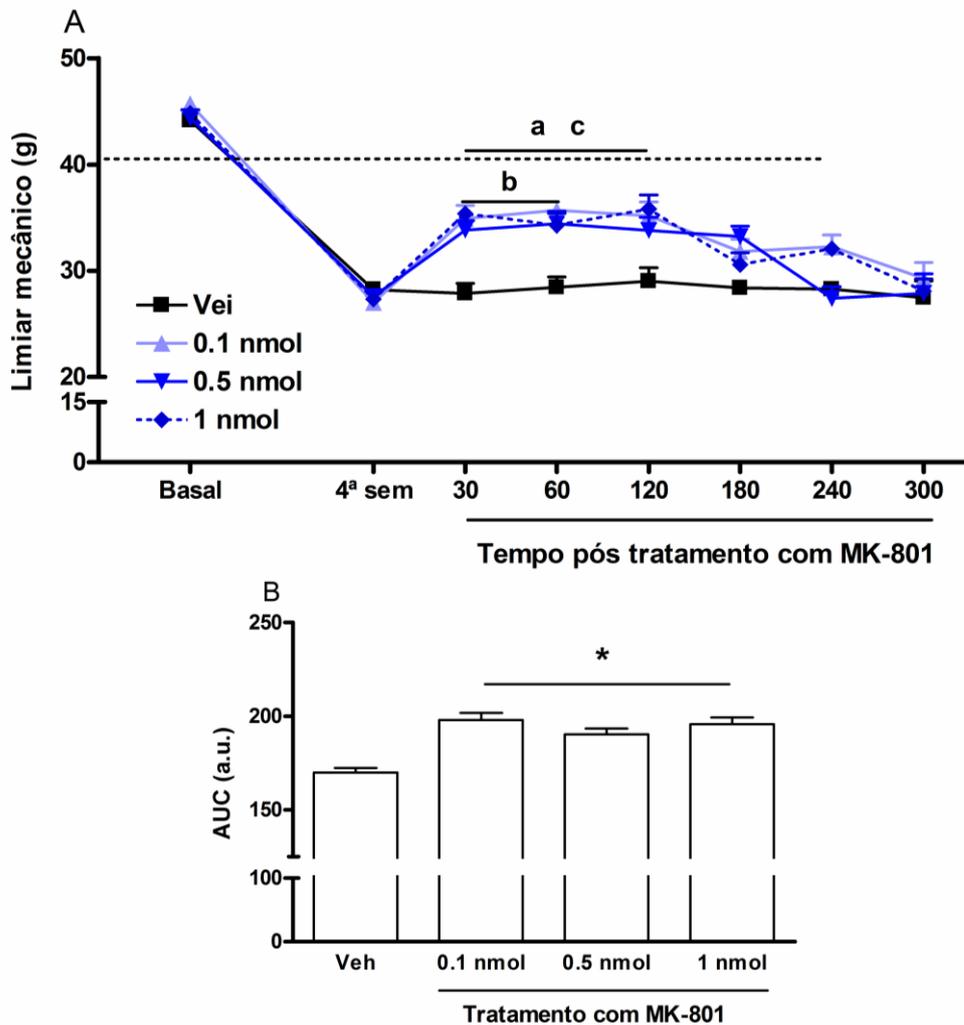
- 1 a administração (120 min). Quando analisado por área sob a curva (AUC; Fig. 5.14,
2 painel B), todas as doses apresentaram significativo efeito antinociceptivo.



- 3 Fig. 5.14 – Efeito do tratamento agudo com JM-6 (25, 50 ou 100 mg/Kg, i.p.) sobre a alodinia
4 mecânica em animais diabéticos por 4 semanas. Painel A: Decurso temporal do efeito do JM-6 sobre
5 a alodinia mecânica. O limiar de retirada ao estímulo mecânico foi avaliado antes da diabetização
6 (Basal), antes dos tratamentos (4ª. Sem) e em diferentes tempos após o tratamento com JM-6 ou
7 veículo (Vei; n=6). A linha tracejada indica o limiar médio do grupo Ngl para efeitos de comparação.
8 Painel B: Área sob a curva (AUC, em unidades arbitrárias, u.a.) do efeito comportamental avaliado
9 desde a medida basal até a 5ª. hora após os tratamentos com Vei ou JM-6. a denota que $p < 0.05$
10 quando comparado o grupo tratado com 25 mg/Kg (n=6) em relação ao grupo Vei; b denota que
11 $p < 0.05$ quando comparado o grupo tratado com 50 mg/Kg (n=6) em relação ao grupo Vei; c denota
12 que $p < 0.05$ quando comparado o grupo que recebeu 100 mg/Kg (n=6) em relação ao grupo Vei, após
13 análise de Two-way ANOVA. * denota que todos os grupos apresentaram diferença em relação ao
14 grupo Vei após análise de One-way ANOVA.

1 **5.14 Efeito do tratamento intratecal com o antagonista de receptores**
2 **NMDA, MK-801 sobre a alodinia mecânica em animais diabéticos.**

3 Dada a atividade agonista de certos produtos da via das quinureninas sobre
4 receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, foi realizado o tratamento intratecal com
5 um bloqueador não seletivo para receptores NMDA, o MK-801, em animais Dbt após
6 4 semanas do início do diabetes. Como mostra a Fig. 5.15 (painel A), o bloqueio
7 espinal de receptores NMDA induziu, com diferentes perfis temporais, efeito
8 antinociceptivo em animais diabéticos 4 semanas do tratamento com STZ. Enquanto
9 a menor e a maior dose testadas (0,1 e 1 nmol, respectivamente) induziu
10 significativo aumento no limiar mecânico após 30 minutos do tratamento persistido
11 até 120 minutos, a dose intermediária (0,5 nmol) induziu efeito antinociceptivo após
12 30 minutos que persistiu até 60 minutos (Fig. 5.15, painel A); Quando analisados os
13 dados através do cálculo de área sob a curva (AUC) todas as dose de MK-801
14 induziram significativo efeito antinociceptivo ($p < 0,05$, Fig 5.15, painel B) quando
15 comparado aos animais diabéticos controle tratados com veículo.



1 Fig. 5.15 – Efeito do tratamento agudo por via intratecal com MK-801 (0,1, 0,5 ou 1 nmol)
 2 sobre a alodinia mecânica em animais diabéticos por 4 semanas. Painel A: Decurso temporal do
 3 efeito do MK-801 sobre a alodinia mecânica. O limiar de retirada ao estímulo mecânico foi avaliado
 4 antes da diabetização (Basal), antes dos tratamentos (4ª. Sem) e em diferentes tempos após o
 5 tratamento com Mk-801 ou veículo (Vei; n=7). A linha tracejada indica o limiar médio do grupo Ngl
 6 para efeitos de comparação. Painel B: Área sob a curva (AUC, em unidades arbitrárias, u.a.) do efeito
 7 comportamental avaliado desde a medida basal até a 5ª, hora após os tratamentos com Vei ou MK-
 8 801. a denota que $p < 0.05$ quando comparado o grupo tratado com 0.1 nmol (n=6) em relação ao
 9 grupo veículo; b denota que $p < 0.05$ quando comparado o grupo tratado com 0.5 nmol (n=6) em
 10 relação ao grupo Vei; c denota que $p < 0.05$ (n=7) quando comparado o grupo que recebeu 1 nmol em
 11 relação ao grupo Vei, após análise de Two-way ANOVA. * denota diferença em relação ao grupo Vei
 12 após análise de One-way ANOVA..

13

14

6. DISCUSSÃO

A polineuropatia distal resultante do diabetes *mellitus* é considerada a complicação tardia mais comum tanto em pacientes com DM tipo 1 quanto com DM tipo 2 (SIMA, 2003). Apesar de serem normalmente referidas como uma só doença, os mecanismos distintos entre as duas etiologias são deixados de lado, podendo residir neste ponto o fato de que tratamentos e drogas promissoras em modelos animais não apresentaram tal efeito na prática clínica (Para revisão: SIMA; KAMIYA, 2006). Uma vez que ambas as formas de diabetes são decorrentes da hiperglicemia, negligencia-se que os mecanismos que a provoca e que dela decorrem possam estar diretamente relacionados aos da geração da polineuropatia (REICHARD et al., 1996). Falando-se mais sobre tais diferenças, apesar de a prevalência de pacientes com DM tipo 2 ser muito maior (IDF ATLAS, 2015), a polineuropatia diabética tende a ser muito mais severa e consistente em pacientes com DM tipo 1 (DYCK et al., 1999). Ademais, acredita-se que em torno da totalidade dos pacientes com DM tipo 1 apresentará a polineuropatia (VINIK et al., 1992), a qual, apesar de todo o avanço obtido nas pesquisas clínica e básica, ainda carece de mais estudos no sentido do entendimento dos mecanismos subjacentes à sua iniciação e manutenção (SIMA, 2003).

A dor neuropática diabética (DND) é reconhecida como um dos sintomas mais devastadores associados à neuropatia diabética (BOULTON et al., 2005), tendo como importante característica o baixo índice de eficácia dos tratamentos utilizados, de modo que a maior parte dos pacientes não alcança o objetivo principal da terapia: o alívio analgésico (BHATTACHARYA et al., 2009; BARRETT et al., 2007). Tal insatisfação está relacionada ao fato de que os medicamentos não são projetados com base nos mecanismos fisiopatológicos da DND, acarretando efeitos colaterais que limitam o seu uso (BOYLE, et al., 2012).

Alguns dos principais sintomas da DND são a presença de alodinia e hiperalgesia, da mesma forma como em outras formas de dores neuropáticas (BARRETT et al., 2007). Ademais, sabe-se que uma das principais queixas de pacientes com DND é a presença de alterações sensoriais frente ao estímulo mecânico (DAULHAC et al., 2006). Em nosso estudo, observamos que os animais induzidos ao diabetes por meio da administração de STZ apresentaram hiperglicemia de modo consistente, com valores acima de 250 mg/dL, logo na 1ª semana após o procedimento (Flg 5.1). Este resultado caracteriza a instalação do

1 quadro diabético de forma definitiva e persistente, visto que mesmo após 6 semanas
2 da diabetização experimental, a glicemia manteve-se elevada (Fig 5.1). No diabetes,
3 sabe-se que o aparecimento destas alterações é fortemente associado ao quadro
4 hiperglicêmico, uma vez que a elevação da glicemia em pacientes sadios, promovido
5 pela infusão de glicose, é capaz de alterar a percepção ao estímulo doloroso nestes
6 indivíduos. Pela curta duração do estado hiperglicêmico neste estudo, acredita-se
7 que haja efeito direto sobre o sistema nervoso periférico (MORLEY et al., 1984). No
8 mesmo sentido, quando animais normoglicêmicos eram submetidos à hiperglicemia
9 local (DH, gânglio e porção inicial de nervo ciático) também apresentam alteração no
10 limiar mecânico, apenas no lado que recebeu a implantação de bomba osmótica,
11 sem comprometimento da glicemia do animal (DOBRETSOV et al., 2003).
12 Entretanto, não há correlação entre as comuns flutuações da glicemia em pacientes
13 diabéticos e alterações da percepção nociceptiva, levando a crer que a cronificação
14 do estado hiperglicêmico seja muito importante nestes indivíduos (CHAN et al.,
15 1990). Ademais, sabe-se que mesmo sob rígido controle da glicose, parte dos
16 pacientes diabéticos ainda permanece com alterações sensoriais, evocadas por
17 outros mecanismos além da hiperglicemia *per se* (DCCT RESEARCH GROUP,
18 1995). O mesmo pode ser verificado quando animais experimentais são submetidos
19 a doses sub-diabetogênicas de estreptozotocina (STZ), sendo possível verificar a
20 presença de alterações sensoriais persistentes e que não são revertidas pelo
21 tratamento com hipoglicemiante (CUNHA et al., 2009). Isto leva à ideia de que a
22 glicose pode induzir toxicidade diretamente, embora a cronificação do estado
23 diabético seja relevante na manutenção do processo.

24 Dada a necessidade de mais estudos sobre a neuropatia diabética e o estado
25 de dor patológica subjacente, principalmente pelo fato de que a DND ocorre de
26 forma mais intensa e preditiva em pacientes com DM tipo 1, modelos animais são
27 necessários e utilizados para maiores informações e testes de novas drogas. Um
28 dos modelos animais mais utilizados é o que promove a destruição de células β
29 pancreáticas por meio da administração de estreptozotocina (STZ), levando ao
30 quadro de DM tipo 1 (SIMA, KAMIYA, 2006). Neste modelo foi demonstrado que
31 animais diabéticos por STZ podem ser divididos entre os que apresentam
32 hiperalgesia mecânica e aqueles que não possuem tal sintoma. Isto demonstra que
33 o modelo assemelha-se ao quadro clínico, no qual nem todos os indivíduos com a
34 síndrome apresentarão o quadro de DND (DAULHAC et al., 2006). Entretanto, há
35 obviamente críticas ao modelo por não mimetizar de forma completa o quadro

1 presente em humanos, devido ao prejuízo metabólico ser exacerbado nestes
2 animais (FOX et al., 1999). Outra desvantagem é a produção de insulina e peptídeo
3 C residuais, assim como a ausência de degeneração nervosa progressiva, uma das
4 características preponderantes em pacientes (SIMA; KAMIYA, 2006). Há, contudo,
5 estudos prévios demonstrando que tal degeneração axonal em animais submetidos
6 ao modelo ocorre após algumas semanas do tratamento com STZ (OBROSOVA et
7 al., 2008; DREL et al., 2007). Tais diferenças podem estar associadas à metodologia
8 de indução ao diabetes e também na quantificação dos resultados.

9 Em diferentes estudos pré-clínicos, as alterações de percepção ao estímulo
10 mecânico são as mais frequentemente encontradas, variando entre 20 a 40% de
11 redução no limiar mecânico (DOBRETSOV et al., 2003). Há o desenvolvimento de
12 alodinia mecânica tanto em animais com DM tipo 1 (REDIVO et al., 2015; CHEN,
13 PAN, 2002), ocorrendo normalmente 2 semanas após a instalação do quadro
14 diabético, e também em animais com DM tipo 2 (LIAO et al., 2011). Similarmente,
15 em nosso estudo os animais tratados com STZ apresentaram tal alteração sensorial,
16 iniciada na 2ª semana após a instalação do quadro e persistindo até a 5ª semana
17 após a indução com STZ (dados não mostrados) (Fig 5.2, painel A). O pico desta
18 alteração sensorial ocorreu na 4ª semana após a indução ao quadro diabético,
19 havendo variação média de 20% entre os grupos normoglicêmico e diabético 4
20 semanas (Fig 5.2, painel B). Assim, confirmou-se o quadro de alodinia mecânica
21 iniciada em estágios iniciais após o início do diabetes, persistente até o fim do
22 estudo.

23 A ausência de estudos sobre a modulação supraespinal nociceptiva é
24 deficitária em pacientes e modelos animais de diabetes provavelmente devido à
25 crença de que a disfunção nervosa no diabetes acomete especialmente nervos
26 periféricos (PAULSON et al., 2007). No entanto, sabe-se que o *input* nociceptivo
27 proveniente da periferia não está aumentado no diabetes (CALCUTT et al., 2002) e
28 que unidades espinotalâmicas (neurônio de segunda ordem medula - tálamo) de
29 animais Dbt apresentam atividade aumentada, assim como campo receptivo maior
30 (CHEN; PAN, 2002). Além disso, estas unidades parecem possuir menor limiar e
31 respostas aumentadas frente ao estímulo mecânico (CHEN; PAN, 2002). Neste
32 sentido, sabe-se que o sistema descendente inibitório possui importante papel na
33 modulação espinal do *input* nociceptivo, papel este realizado especialmente por
34 meio de transmissões serotoninérgicas e noradrenérgicas (para revisão, ver: MILLAN,
35 2002). Este sistema está também envolvido no mecanismo de algumas das drogas

1 utilizadas no controle da dor crônica, inclusive da DND (KWON et al., 2014;
2 NIESTERS et al., 2014).

3 No contexto do diabetes, é demonstrado que a transmissão serotoninérgica
4 espinhal em resposta ao estímulo opioidérgico é reduzida (SUH et al., 1996), assim
5 como há menor tônus descendente inibitório no DH (PETROU et al., 2012), menor
6 nível de serotonina no tronco encefálico (EZZELDIN et al., 2014), hipocampo (DA
7 SILVA DIAS et al., 2015) e medula (HENLEY, BELUSH, 1992) de animais
8 diabéticos. Uma possibilidade é o fato de haver menor quantidade de aminoácidos
9 no cérebro em animais diabéticos, levando à menor produção de serotonina
10 (MAJARREZ-GUTIÉRREZ et al., 1998). Neste sentido, animais com diabetes
11 induzido por STZ foi verificado que os níveis cerebrais de triptofano (Trp) são
12 reduzidos, mesmo quando as concentrações plasmáticas deste aminoácido estavam
13 aumentadas em resposta à ingesta (FERNSTROM, FERNSTROM, 1993). Da
14 mesma forma, foi verificado a redução no metabolismo da serotonina em animais
15 Dbt (HENLEY et al., 1998), levando à ideia de que a redução de serotonina pode
16 estar presente em animais Dbt e estar associada ao quadro de DND. Assim, nós
17 avaliamos primeiramente, os níveis de serotonina na medula espinhal de animais
18 diabéticos e verificamos que nestes animais (4 semanas após a indução ao
19 diabetes) houve redução dos níveis de serotonina na medula espinhal em relação
20 aos animais Ngl (Fig 5.3, Painel A). Esta redução pode estar associada a redução do
21 limiar de retirada ao estímulo mecânico, pois estudos anteriores comparando
22 linhagens distintas de ratos que possuem diferenças quanto a homeostase central e
23 periférica de serotonina (linhagens animais com diferenças em suas concentrações
24 séricas do neurotransmissor devido a mutações), verificou-se que aqueles que
25 apresentavam homeostase aumentada para serotonina possuíam maior limiar a
26 estímulos térmico (KESIC et al., 2015) e mecânico (TVRDEIC et al., 2004). Além
27 disso, as linhagens também possuíam diferenças quanto às respostas a drogas
28 serotoninérgicas, levando à ideia de que o maior benefício de tais drogas para o grupo
29 com menores níveis de serotonina pode estar relacionado à redução do tônus deste
30 neurotransmissor (KESIC et al., 2015). Também observamos que a taxa de
31 renovação desta monoamina estava diminuída em animais Dbt, uma vez que
32 relação entre metabólito/neurotransmissor é significativamente maior nestes animais
33 (Fig 5.3, Painel B). Acredita-se que tal relação possa sinalizar a atividade do sistema
34 em questão, sendo que quanto maior é a produção do neurotransmissor, maior a
35 atividade do sistema relacionado (COMMISSIONING, 1985). Dados tais resultados,

1 é possível inferir que os níveis de serotonina reduzidos, assim como sua taxa de
2 renovação diminuída possam estar relacionados às alterações sensoriais no modelo
3 de DND induzido por STZ. Em modelos de dor neuropática, drogas que atuam sobre
4 o sistema serotoninérgico são capazes de promover o aumento deste
5 neurotransmissor, reduzindo a proporção entre metabólito/neurotransmissor (MURAI
6 et al., 2014; TVRDEIC et al., 2004). Assim, decidimos verificar se o tratamento com
7 fluoxetina (inibidor da recaptação de serotonina - Flx), teria efeito sobre o quadro de
8 hipersensibilidade ao estímulo mecânico. O tratamento foi iniciado na segunda
9 semana após a indução ao quadro diabético, momento em que os animais já
10 apresentavam alterações sensoriais significativamente diferentes dos animais Ngl
11 (Fig 5.2, Painel A). Continuamos o tratamento por 2 semanas, período descrito na
12 literatura para a verificação de efeito antinociceptivo (SALINAS et al., 2012). Em
13 nosso estudo, houve prevenção da queda subsequente no limiar mecânico nos
14 animais tratados somente com a dose intermediária de Flx (10 mg/Kg) 7 ou 14 dias
15 após o início do tratamento (Fig 5.4, Painel A). Doses maiores (15 e 20 mg/Kg)
16 foram testadas, mas uma vez que a condição geral dos animais piorou após o
17 tratamento, estes foram suspensos. Em outros estudos com modelos de dor
18 neuropática, o uso da Flx também demonstrou-se efetivo (MURAD; AYUOB, 2015;
19 BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2014), assim como na DND (TEMBHURNE;
20 SAKARKAR, 2011; ANJANEYULU; CHOPRA, 2004). Acredita-se que a Flx tenha
21 efeito sensível ao bloqueio de receptores opioides, demonstrando a participação
22 deste sistema na antinocicepção gerada pela Flx (SINGH et al., 2001). Em animais
23 Dbt, foi verificado que o efeito da Flx é dependente de receptores 5HT1/2
24 (ANJANEYULU, CHOPRA, 2004), o qual pode estar associado ao efeito
25 hipoglicemiante e neuroprotetor neste modelo de DND (TEMBHURNE; SAKARKAR,
26 2011). Quando uma droga com mecanismo similar à Flx (fluvoxamina) foi utilizada
27 em animais Dbt, foram obtidos resultados próximos aos encontrados por nós, dado o
28 efeito antinociceptivo da droga ser também sobre receptores 5HT, com papel
29 temporal dos diferentes receptores serotoninérgicos para o efeito (KATO et al, 2013).
30 É necessário também citar que o aumento de serotonina pode possuir efeitos
31 ambíguos, podendo causar anti ou pronocicepção, dependendo do receptor ativado
32 (CERVANTES-DURÁN et al., 2013).

33 Apesar dos aparentes benefícios do uso da Flx em estudos pré clínicos, em
34 pacientes diabéticos não se consegue alcançar o mesmo efeito (JANN; SLADE,
35 2007). Uma possibilidade seria, como anteriormente citado, a reduzida produção de

1 serotonina ou então o aumento de sua degradação. Em modelo de diabetes induzido
2 por STZ foi encontrado que a afinidade para o Trp da enzima triptofano hidroxilase
3 (TrpOH), passo limitante para a formação de serotonina, está reduzida no cérebro
4 destes animais, assim como a velocidade de reação (HERRERA et al., 2005). Neste
5 sentido, pode haver facilitação de outras vias envolvidas no metabolismo do Trp,
6 como a ativação da via IDO1/KYN, responsável pela maior parte do consumo deste
7 aminoácido (WU et al., 2013; WIDNER et al., 2002). Esta via ainda não foi avaliada
8 no contexto do diabetes, de modo que ao nosso conhecimento, esta é a primeira
9 investigação a respeito do papel da via na DND.

10 A enzima indolamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) tem surgido em pesquisas
11 recentemente devido ao seu papel sobre a regulação e modulação do quadro
12 inflamatório e imune (MUNN et al., 2004; GROHMANN et al., 2003), além de estar
13 intimamente relacionada à depleção da função serotoninérgica, com consequente
14 acúmulo das chamadas quinureninas (KYN) (WIDNER et al., 2002). Tal depleção se
15 deve ao fato de a IDO1 ser a enzima passo-limitante capaz de metabolizar o L-Trp
16 para a formação das KYN, desviando o aminoácido da formação de serotonina
17 (OXENKRUG et al., 2015; SCHWARCZ, 2012).

18 Em trabalho com animais diabéticos obesos (linhagem db/db) acerca do
19 quadro de nefropatia, outra complicação bastante comum, foi determinado o
20 aumento na expressão da enzima IDO nos rins destes animais (BABAN et al., 2013).
21 Em estudo relacionando os comportamentos tipo-depressivo e o nociceptivo em
22 animais submetidos ao modelo de dor inflamatória, verificou-se aumento da
23 expressão de IDO1 no hipocampo, com aumento nos níveis de KYN e redução na
24 quantidade de serotonina nesta região encefálica. Da mesma forma, houve aumento
25 na expressão e atividade de IDO1 em amostras de sangue de pacientes
26 apresentando dor e depressão (KIM et al., 2012), indicando que estas condições
27 poderiam estar modulando ou serem moduladas pela ação da enzima. Em nosso
28 estudo, no entanto, não foram encontradas diferenças quanto a expressão da
29 enzima IDO1 em tecido nervoso central (cordão espinhal) de animais Dbt em
30 diferentes tempos após a indução do quadro hiperglicêmico (Fig 5.5, painel A),
31 resultado corroborado por estudos prévios (HUANG et al., 2016; ZHOU et al., 2015).
32 Embora não tenham observado aumento na expressão da enzima, ambos os
33 estudos mostraram o aumento da atividade da via, levando à crença de que IDO1
34 pode não ter sua expressão alterada, mas sim sua atividade enzimática. É
35 importante salientar que em nosso modelo, as alterações sensoriais são derivadas

1 do distúrbio metabólico, diferentemente das etiologias supra-referidas.

2 Para complementar este resultado, realizamos a análise de
3 imunofluorescência para a enzima IDO1 em amostras de cordão espinhal de
4 animais diabéticos na terceira e na quarta semana após a diabetização, tempos
5 estes que na análise de expressão de IDO1 por meio de *western blot* há tendência
6 de aumento da expressão e no pico da hipersensibilidade mecânica,
7 respectivamente (Fig 5.6, Painéis A e B). Em relação à marcação presente no animal
8 Ngl, não foi possível verificar diferença no perfil de expressão na medula dos
9 animais Dbt na 3^a ou 4^a semanas pós diabetização. O perfil de distribuição de IDO1
10 neste tecido, no entanto, não parece ser condizente com neurônios, uma vez que a
11 fluorescência para o marcador parece estar em formato tubular contínuo, podendo
12 ser mais próximo de uma expressão em endotélio vascular, dada sua presença já ter
13 sido observado neste tecido (JACKMAN et al., 2011). Apesar de ser a primeira, e
14 portanto, enzima passo-limitante da via, outras enzimas estão também diretamente
15 envolvidas no processo de geração das KYN (para revisão, ver: LÖB et al., 2009), de
16 modo que mesmo que a expressão da enzima IDO1 não esteja alterada, sua ação
17 pode estar modulada, ou outras enzimas podem estar participando de modo mais
18 ativo neste contexto. No diabetes, pacientes apresentam maiores taxas de Kyn (L-
19 quinurenina), KYNA (ácido quinurênico) e 3-OHAA (ácido 3 hidroxiantranílico) que
20 indivíduos normoglicêmicos, sugerindo que estes metabólitos possam apresentar
21 efeito diabetogênico, além de sugerir o aumento da ação de IDO ou enzimas
22 análogas (OXENKRUG et al., 2015), fato suportado por outro estudo com pacientes
23 obesos (WOLOWCZUK et al., 2012). Ademais, em pacientes com retinopatia
24 diabética, foram encontrados níveis mais elevados de IDO1 e os metabólitos do Trp
25 em relação àqueles indivíduos controle (MUNIPALLY et al., 2011; KANTH et al.,
26 2009; ANDRZEJEWSKA-BUZCKO et al., 2001). Em animais Dbt foi também
27 verificado o aumento da expressão da enzima IDO1 em células microgliais,
28 relacionado ao aumento da perda neuronal (HU et al., 2015), somando argumentos
29 para a hipótese de que a via possa encontrar-se mais ativa nesta condição.

30 Em outros estudos, foi demonstrado que a maior parte das KYN presentes em
31 tecidos centrais eram produzidas na periferia, sendo provavelmente transportadas
32 para o SNC, onde atuariam (KITA et al., 2002). Esta hipótese é corroborada pela
33 produção aumentada de Kyn e KYNA em hepatócitos de animais Dbt (SASAKI et al.,
34 2009). Em outro recente estudo, foi verificado que a produção espinhal de RNAm
35 para IDO1 não foi alterada em modelo de dor neuropática, apesar do aumento de

1 ativação da via periféricamente (maior taxa Kyn/Trp plasmática) (ZHOU et al., 2015).
2 Do mesmo modo, pacientes com dor de síndrome complexa regional também
3 possuem aumento da ativação da via naqueles com maior score de dor
4 (ALEXANDER et al., 2013). Ademais, outra recente pesquisa mostrou que o
5 comportamento tipo-depressivo em animais Dbt pode ser considerado como “mais
6 dependente” da ação de IDO1 no SNC (DA SILVA DIAS et al., 2015), assim como
7 em pacientes com depressão e dor comórbida (KIM et al., 2012). Assim, é possível
8 afirmar que IDO1 pode ser diferentemente modulada, mesmo que não sua
9 expressão, mas em sua ação.

10 Uma vez que a expressão da enzima não foi alterada pelo quadro diabético,
11 mas podendo haver mudanças na ativação da via, procuramos como primeira
12 abordagem o bloqueio farmacológico de IDO1, utilizando-se para tal fim o 1-L-MT (1-
13 L-metil triptofano). Sabe-se que IDO1 é capaz de ligar-se a ambas as isoformas de
14 Trp (D e L), embora sua afinidade seja maior para a forma levogira, forma esta mais
15 prevalente em mamíferos (Para revisão, ver: LÖB et al., 2009). Assim, explica-se a
16 afinidade 10 vezes superior da enzima para o 1-L-MT do que para o 1-D-MT, ambas
17 isoformas do inibidor competitivo da IDO1 (PETERSON et al., 1994). Há estudo
18 mostrando que a forma destrógira do inibidor não é capaz de bloquear IDO1, mas
19 sim IDO2, a outra isoforma da enzima (METZ et al., 2007). Em estudos com câncer,
20 o uso do 1MT como bloqueador de IDO1 demonstrou efeito antitumoral, embora sua
21 ação seja potencializada no tratamento como adjuvante de quimioterápicos (para
22 revisão, ver: LÖB et al., 2009).

23 Em nosso estudo, realizamos o bloqueio farmacológico de IDO1 após a 3^a
24 semana da indução ao diabetes (Fig 5.7, Painéis A e B), por ser o momento de
25 maior tendência ao aumento da enzima nos diferentes tempos avaliados. Também
26 realizamos o tratamento na 4^a semana após o início do quadro diabético (Fig 5.8,
27 Painéis A e B), por ser o pico da hipersensibilidade mecânica em nossos animais.
28 Verificamos que quando os animais receberam o inibidor da IDO1 na 3^a semana
29 após a instalação do diabetes, doses mais baixas promoveram antinocicepção (Fig
30 5.7, Painel A), embora quando realizada a análise de AUC, todas as doses tenham
31 revelado tal efeito (Fig 5.7, Painel B). Quando o tratamento foi realizado na semana
32 subsequente, verificamos que a dose mais elevada promoveu o aumento do limiar
33 mecânico (Fig 5.8, Painel A), e de modo similar ao ocorrido na semana anterior,
34 todas as doses promoveram antinocicepção quando a AUC foi realizada (Fig 5.7,
35 Painel B). Tais diferenças entre o decurso temporal e a AUC podem estar ligadas às

1 pequenas flutuações nos limiares aferidos durante o decurso, como é possível
2 perceber pelos gráficos. Embora em nosso estudo, o bloqueio farmacológico
3 resultou, ainda que temporariamente, em reversão da hipersensibilidade mecânica
4 em animais Dbt, estudo prévios tem observado que a deleção gênica de *Ido1* não
5 resultou em diferença quanto ao limiar mecânico em animais submetidos ao modelo
6 de dor neuropática (SNI; ZHOU et al., 2015). É descrito que o 1-MT parece ter outros
7 efeitos além da inibição direta sobre IDO1 (STEINMAN; BANCHEREAU, 2007), e um
8 efeito inibitório sobre o transportador de Trp em membranas (KUDO; BOYD, 2001).
9 Em modelo pré-clínico de artrite reumatoide, o uso combinado de 1MT com
10 metotrexato apresentou efeito sinérgico do que quando usado isoladamente. Neste
11 modelo, seu mecanismo não envolveu a redução da produção de citocinas, mas
12 inibição do metabolismo do folato (PIGOTT et al., 2014), demonstrando que
13 diferentes mecanismos podem ser contabilizados para o resultado final observado.

14 De modo semelhante a outro trabalho utilizando o CFA como estímulo
15 inflamatório, (KIM et al., 2012), nossos resultados apontam para o efeito
16 antinociceptivo de curta duração quando o 1-MT foi utilizado na 3ª semana pós STZ,
17 ao passo que este efeito (Fig 5.7, Painel A) foi mais prolongado (2 horas) quando a
18 maior dose foi utilizada em animais após a 4ª semana do diabetes (Fig 5.8, Painel
19 A). Outro estudo de nosso grupo também demonstrou o efeito benéfico do uso de 1-
20 MT em outra desordem relacionada ao diabetes (DA SILVA DIAS et al., 2015),
21 embora esta seja a primeira ocorrência de efeito antinociceptivo deste composto em
22 modelo de dor neuropática. Diferentemente da chamada isoforma hepática (TDO), a
23 qual apresenta ativação constitutiva, IDO1 apresenta perfil mais induzível, sendo
24 estimulada sob condições inflamatórias (FUJIGAKI et al., 2006). Na presença de
25 lesão nervosa, diversas citocinas são localmente produzidas e liberadas,
26 principalmente IL-1 β , IL-6 e TNF α (RITNER et al., 2009). Estas citocinas são
27 capazes de modular o ambiente inflamatório, atuando sobre a fosforilação de
28 receptores NMDA (YAN; WENG, 2013), expressão de COX-2 (CHAUHAN et al.,
29 2012) ou induzindo a expressão de canais de sódio voltagem dependentes em
30 animais diabéticos (HUANG et al., 2014b). Apesar de muito estudado, o papel
31 das citocinas inflamatórias na geração das alterações sensoriais do diabetes ainda
32 não completamente entendido. Nossos dados revelaram que as citocinas pró-
33 inflamatórias presentes em nervo periférico foram semelhantes em animais Ngl e Dbt
34 após 2 e 3 semanas do início do diabetes, ao passo que IL-1 β e TNF α
35 apresentaram-se reduzidos em animais na 4ª semana após a indução (Fig 5.9,

1 Painéis A, B e C). Estudos prévios , no entanto, demonstraram que animais
2 diabéticos apresentam aumento de IL-6 e TNF α em nervo ciático após 2 e 4
3 semanas do início do diabetes (NEGI; SHARMA, 2015), assim como também de IL-
4 1 β (YOUSEFZADEH, et al., 2015). O aumento da IL-6 parece estar associado ao
5 dano em fibras mielinizadas de maior calibre em pacientes diabéticos (MAGRINELLI
6 et al., 2015). Entretanto, em outro estudo foi observado redução da produção de IL-
7 1 β no gânglio da raiz dorsal e no nervo ciático em animais Dbt, a qual pode estar
8 ligada à redução do crescimento do neurito e disfunção mitocondrial (SALEH et al.,
9 2013). Em outro estudo, foi demonstrado que a administração de TNF α é capaz de
10 promover redução na velocidade de condução em animais Dbt, mas não em animais
11 Ngl (SATOH et al., 1998). Tais dados, podem ser representativos de menor tônus
12 inflamatório nestes animais, ou ainda devido à menor capacidade de produção e
13 liberação de tais citocinas por células periféricas em resposta ao estímulo
14 inflamatório, como previamente demonstrado (DOXEY et al., 1998). Neste sentido, a
15 produção basal de IL-6 e TNF α em células sanguíneas de diabéticos está reduzida
16 em relação às amostras de indivíduos normoglicêmicos (PICKUP et al., 2000), assim
17 como evidenciado para macrófagos de animais da linhagem db/db, os quais
18 recuperaram o potencial de cicatrização após a suplementação com IL-1 β
19 (MARUYAMA et al., 2007). Assim, é possível um desbalanço nas citocinas pró
20 inflamatórias dependendo do tempo e da natureza do estímulo em diferentes
21 modelos de diabetes ou mesmo em pacientes. No cordão espinhal também foi
22 encontrado que estas mesmas citocinas pró-inflamatórias estariam aumentadas,
23 como em tecidos periféricos de animais Dbt (SUN et al., 2015). Quando expostos à
24 hiperglicemia crônica, houve aumento na produção de TNF α em tecidos
25 microvasculares e neuronais, levando à lesão nestes tecidos (SATOH et al., 2003).

26 Não se sabe se o recrutamento de leucócitos para o local de lesão durante o
27 processo inflamatório pode ter efeitos distintos sobre o aumento ou redução do
28 comportamento nociceptivo, uma vez que é possível a produção de citocinas pro ou
29 antiinflamatórias (LIOU et al., 2011). Em nosso trabalho, não encontramos
30 diferenças entre os diferentes grupos analisados quanto às mesmas citocinas
31 avaliadas perifericamente (Fig 5.9, Painéis D, E e F). É possível que o baixo
32 estímulo inflamatório em tecidos centrais e periféricos pode estar associado com a
33 ausência de diferença estatística de IDO1, do mesmo modo como em outro trabalho
34 com modelo de dor neuropática (ZHOU et al., 2015), especialmente porque a
35 sensibilização espinhal é mais tardia e dependente da sensibilização periférica (para

1 revisão, ver: MILLAN et al., 2002). Com relação à via IDO1/KYN, sabe-se que IL-1 β é
2 capaz de induzir a expressão de RNAm para IDO1 em ilhotas pancreáticas de
3 roedores (Liu et al., 2015) da mesma maneira como em células progenitoras
4 hipocampais humanas (ZUNSZAIN et al., 2012). Além disso, esta citocina também é
5 capaz de aumentar o RNAm e os níveis de proteína para KMO em células β
6 pancreáticas (LIU et al., 2015).

7 Em uma recente pesquisa, o chamado *sickness behavior*, comportamento
8 tipo-depressivo induzido por estímulo inflamatório sistêmico, levou ao aumento de
9 TNF α e aumento da atividade da via de produção das KYN, embora o bloqueio de
10 IDO1 apenas reduzisse a produção dos metabólitos do Trp, sem modificar o
11 comportamento de anedonia, levando à ideia de que a ativação da via das KYN
12 possa ser consequência do ambiente pró-inflamatório e não necessário para sua
13 iniciação (CATHOMAS et al., 2015). Entretanto, outra pesquisa demonstrou que a
14 expressão aumentada de IDO1 e de citocina pró-inflamatória (IL-6) em tecido
15 nervoso, frente modelo semelhante (indução por LPS) a ablação genética de *Ido1*
16 resultou em melhora tanto no comportamento tipo-depressivo quanto no nociceptivo
17 (Kim et al., 2012). Neste mesmo trabalho mostrou-se que a administração de IL-6 foi
18 capaz de regular a expressão de IDO1, assim como IL-1 (ZHOU et al., 2015). Em
19 outro estudo (ROJEWSKA et al., 2016), a ativação da via KYN foi associada ao
20 comprometimento sensorial e também com a ativação de células gliais. Deste modo,
21 nós nos propusemos a investigar o grau de ativação glial em nosso modelo de DND.

22 Dada a correlação entre a ativação de células gliais em quadros de dor
23 crônica (MILLIGAN, WATKINS, 2009), procuramos investigar o nível de atividade de
24 tais células, utilizando-se marcadores para astrócitos (GFAP) e micróglia (IBA-1).
25 Acredita-se que haja diferenças temporais quanto à ativação de tais células, iniciada
26 com a microglial, seguida pela ativação astrocítica (SCHOLZ, WOOLF, 2007). Além
27 disso, a via das KYN é predominantemente ativa em macrófagos e micróglia
28 (GUILLEMIN et al., 2003), justificando a análise da ativação de tais tipos celulares.
29 Nossos resultados de expressão de marcador microglial (IBA-1) não apontaram para
30 diferença entre os grupos analisados (Fig 5.10). Este resultado é semelhante ao
31 encontrado por Byrne e colegas, em modelo de DM tipo 2 no qual a ativação
32 microglial surgiu apenas em *time points* mais tardios, sugerindo papel transitório no
33 desenvolvimento de alterações sensoriais (BYRNE et al., 2015).

34 O estado diabético pode induzir à ativação microglial por meio do estresse
35 oxidativo e mudanças na função elétrica no neurônio, levando à resposta

1 inflamatória que inclui a produção e liberação de IL-1 β , IL-6, TNF- α e outros fatores
2 que possuem efeitos pleiotrópicos (SKUNDRIC, LISAK, 2003). Esta ativação foi
3 descrita na medula de animais Dbt relacionada à ativação de MAPK (CHENG et al.,
4 2014), sendo que o uso crônico de inibidores microgliais promove redução na
5 hiperalgesia mecânica (DAULHAC et al., 2006). De modo similar, a gabapentina,
6 droga da classe dos gabapentinóides, promove redução na ativação microglial, com
7 resultado positivo sobre as alterações sensoriais (WODARSKI et al., 2009). Nesta
8 mesma pesquisa, foi visto que a ativação microglial persistiu por até 6 meses, ao
9 passo que a população de astrócitos esteve reduzida. Também foi observado que o
10 aumento da KMO (importante enzima da via de formação das KYN) na dor
11 neuropática, associada à ativação microglial e revertida pelo uso de minociclina
12 (ROJEWSKA et al., 2016). Em modelo de DM tipo 2 foi encontrado que células
13 astrocíticas, mas não microgliais estavam ativadas no DH, uma vez que somente o
14 uso de inibidores astrocíticos, mas não de microglia, induziu efeito antinociceptivo
15 (LIAO et al., 2011). Assim, é possível que os sintomas sensoriais encontrados por
16 nós não sejam provenientes de ativação microglial, uma vez que os níveis de
17 citocinas não estiveram alterados em nosso modelo. É possível que outros
18 mecanismos estejam envolvidos, e como alguns estudos apontam para a
19 importância de células astrocíticas, partimos para a observação da ativação de tais
20 células.

21 Com relação à ativação de astrócitos, sabe-se que o GFAP compõe o
22 citosqueleto de astrócitos maduros, controlando o formato de tais células
23 (WEINSTEIN et al., 1991). A produção de GFAP é aumentada após lesão, formando
24 ramificações e tortuosidades dos processos astrocíticos (ENG et al., 2000). Dado o
25 desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica (Fig 5.2, Painéis A e B) foi seguido
26 pela redução inicial da quantidade de GFAP nas primeiras semanas após o início do
27 diabetes (Fig 5.11), sendo possível esta ser uma resposta das células frente à lesão,
28 em seus estágios primários, ou ainda participar no processo de geração da DND. O
29 fato é que estes mecanismos ainda não são completamente entendidos (HANANI et
30 al., 2014). Uma possibilidade seria o aumento do uso de glicose pelos astrócitos nos
31 estágios iniciais do diabetes, sendo esta alteração metabólica corrigida em estágios
32 mais tardios (SICKMANN; WAAGEPETERSEN, 2015). Há informações conflitantes a
33 respeito da relevância destas células na DND. Enquanto alguns estudos indicam um
34 aumento no conteúdo de GFAP em regiões cerebrais diferentes (BAYDAS et al.,
35 2003), ou no gânglio da raiz dorsal (HANANI et al., 2014), há estudos em que o

1 GFAP esteve reduzido em 30% no DH de animais Dbt após 6 semanas, chegando a
2 perda de 40% após outras 6 semanas (AFSARI et al., 2008). Tal redução também foi
3 verificada no SNC por Coleman e colegas, mas nem o número de células, nem a
4 expressão de receptores de glutamato foram distintas entre animais Ngl e Dbt,
5 independentemente do *time point* após a indução ao diabetes (COLEMAN et al.,
6 2004).

7 A disfunção na recaptação de glutamato da fenda sináptica está associada à
8 neurodegeneração e excitotoxicidade (ROTHSTEIN et al., 1996). Isto pode levar à
9 ideia de que estas células apresentam distúrbios funcionais e metabólicos ligados ao
10 *déficit* em seu suporte aos neurônios (AFSARI et al., 2008), sem que haja apoptose
11 de tais células (COLEMAN et al., 2004). Diferentemente de outros estudos na área,
12 nossos resultados apontam para uma inicial redução na quantidade de GFAP no
13 cordão espinal de animais Dbt (Fig 5.11, Painel A), a qual pode estar ligada à
14 mudança no metabolismo e na capacidade funcional de astrócitos, e a uma redução
15 em sua habilidade em manter o seu suporte aos neurônios. Acredita-se que a
16 redução no GFAP possa ser resposta à ausência do papel regulatório da insulina,
17 alterando a morfologia destas células (AIZENMAN; DE VELLIS, 1987). Em nosso
18 estudo, demonstramos que a expressão de GFAP é restaurada na 4ª semana após
19 o início do diabetes em relação ao grupo Ngl (Fig 5.11, Painel A). Sabe-se que estas
20 células são também responsáveis pela formação da barreira hematoencefálica
21 (ABBOTT, 2002), a qual apresenta alterações em pacientes diabéticos, levando à
22 facilitação da entrada e saída de moléculas da periferia e contribuindo para a
23 microangiopatia em tecidos nervosos centrais destes pacientes (STARR et al.,
24 2003).

25 Os resultados de expressão proteica de GFAP foram complementados com a
26 imunofluorescência realizada para o mesmo marcador, realizado em medula
27 espinal de animais do grupo Ngl e Dbt após 3 e 4 semanas, dada as diferenças de
28 expressão (por *western blot*) entre estes diferentes *time points* no grupo Dbt. Em
29 nossas análises, observamos que a ramificação ou formação de processos em
30 astrócitos é marcante em animais Ngl, mais que em animais Dbt (Fig 5.12, Painéis
31 A, B e C). Ademais, observamos que a morfologia das células em animais do grupo
32 Dbt é claramente menos pronunciada em animais do grupo após 3 semanas do
33 tratamento com STZ do que nos animais após 4 semanas do tratamento com STZ.
34 Isto pode significar que apesar da ausência de insulina poder levar à expressão de
35 morfologia com menor número de projeções, as células foram capazes de se

1 recuperar e recompensar tal alteração para uma morfologia mais próxima do normal
2 (Fig 5.12 – Painéis B e C). Entretanto, mesmo a morfologia de astrócitos podendo
3 ser assemelhada em animais Ngl e Dbt após 4 semanas, a função de tais células
4 provavelmente permanece alterada na condição diabética. Evidências vêm do fato
5 de que a presença de insulina estimula em 3 vezes a expressão de glutamina
6 sintetase (GS), sendo este um marcador de maturação de astrócitos, e necessário
7 para evitar excitotoxicidade (AIZENMAN; DE VELLIS, 1987). Neste sentido, sabe-se
8 que o glicogênio cerebral é estocado apenas em astrócitos, ocorrendo seu
9 metabolismo dentro da célula. Uma vez que pacientes com DM tipo 1 apresentam
10 menor quantidade de glicogênio em astrócitos (OZ et al., 2012), é possível dizer que
11 a quantidade de glicogênio dentro dos astrócitos pode contribuir para a morfologia
12 plana dos astrócitos. Foi demonstrado que os astrócitos quando tratados com QUIN,
13 um agonista de receptores NMDA, promoveu mudanças na morfologia de tais
14 células, tornando-as mais fusiformes, além de haver hiperfosforilação de PKA e PKC
15 (PIEROZAN et al., 2014). Em uma recente publicação foi verificado que as
16 alterações morfológicas em células gliais frente estímulo inflamatório foram
17 observadas após o pico de produção de citocinas, de modo que somente as
18 mudanças morfológicas observadas estavam associadas com a fase de resolução.
19 Assim, o auge da produção de citocinas não foi simultâneo com as alterações
20 estruturais (NORDEN et al., 2016), o que vai de encontro com nossos resultados, em
21 especial com a análise de imunofluorescência para o marcador de astrócitos, o
22 GFAP (Fig 5.12). Em trabalho prévio, animais com DM tipo 2 apresentaram
23 ativação astrocítica, mas não microglial (LIAO et al., 2011). Em nosso trabalho,
24 encontramos uma tendência, embora não significativa, de aumento de marcador de
25 ativação astrocítica (Fig 5.11, painel A), sem diferenças quanto ao marcador de
26 microglia (Fig 5.10, Painel B). Neste estudo, somente o uso de inibidor de astrócitos,
27 e não de inibidor microglial, foi hábil em reduzir a alodinia mecânica, demonstrando a
28 relação entre a ativação das células astrocíticas e o comportamento verificado em
29 animais diabéticos (LIAO et al., 2011). Neste sentido, um estudo verificou que
30 células gliais expostas ao meio hiperglicêmico apresentam maior dano oxidativo e
31 nitrosativo, alteração em suas vias intracelulares e maior índice de apoptose
32 (KUMAR et al., 2014). Tal informação pode explicar em parte nossos resultados,
33 dado que se a população glial estiver reduzida na amostra, possivelmente a ativação
34 das células restantes será mais difícil de ser verificada pela análise de marcador
35 celular por *western blot*. Também é possível que a produção de citocinas pró-

1 inflamatórias periféricas e centrais (Fig 5.9) seja comprometida pelo decréscimo na
2 população glial.

3 A kinurenina 3-monooxigenase, conhecida como KMO, é uma enzima da via
4 das KYN que tem ganhado atenção recentemente, devido sua importância em
5 diferentes aspectos, tais como neurodegeneração (WILSON et al., 2014;
6 SCHWARCZ et al., 2012), depressão (MAES et al., 2011) e imunologia (para
7 revisão, ver: GROHMANN et al., 2002). Esta enzima é responsável pela conversão
8 de L-kynurenina (Kyn) em 3-hidroxiquinurenina (3-HK), processo que por fim leva à
9 formação de ácido quinulínico (QUIN), agonista endógeno e seletivo para receptores
10 NMDA (SCHWARCZ et al., 2012). Nosso estudo demonstrou que não houve
11 diferença entre a expressão de KMO entre os grupos Ngl e Dbt nos diferentes *time*
12 *points*, embora haja uma interessante tendência à redução destes níveis após 2 e 3
13 semanas do início do quadro diabético (Fig 5.13, Painel A), similarmente como
14 observado para o GFAP (Fig 5.11, Painel A). Uma vez que a via das KYN é
15 predominantemente ativa em macrófagos e células microgliais (GUILLEMIN et al.,
16 2003), é possível que a ausência de ativação destas células possa ser relacionada
17 com a ausência do aumento da expressão da KMO nos diferentes tempos
18 analisados no diabetes. Assim, apesar da ausência de diferença estatística entre os
19 grupos, a expressão de KMO parece ter relevância biológica uma vez que
20 publicações revelaram em pacientes diabéticos aumento da expressão de KMO em
21 macrófagos, relacionando obesidade e inflamação nestes pacientes (FAVANNEC et
22 al., 2015). Nossos dados, associados ao dado de que hepatócitos de ratos
23 diabéticos produzem mais Kyn e KYNA (SASAKI et al., 2009), assim como células β
24 pancreáticas de rato são capazes de aumentar a expressão de RNAm para KMO
25 após desafio com sobrecarga de glicose (LIU et al., 2015), apontam para a
26 contribuição de tecidos periféricos para o aumento da atividade de KMO. Neste
27 sentido, haveria também a possibilidade de que as quinureninas produzidas na
28 periferia fossem transportadas através da barreira hematoencefálica (KITA et al.,
29 2002), dada a maior presença destes metabólitos na periferia (ZHOU et al., 2015).

30 Outro trabalho demonstrou em modelo de neuroinflamação que o bloqueio
31 periférico da KMO é capaz de aumentar os níveis de KYNA, melhorando o quadro de
32 neurodegeneração (ZWILLING et al., 2011). Já na dor neuropática, dados não
33 publicados (porém citados) por Zhou e colaboradores revelaram que a expressão de
34 KMO estaria aumentada no cérebro de animais em modelo de SNI (ZHOU et al.,
35 2015). No mesmo sentido, em outro estudo utilizando modelo de mononeuropatia

1 ocorreu aumento na transcrição de KMO no cordão espinhal, sendo que o bloqueio
2 farmacológico da enzima reduziu as citocinas pró inflamatórias, tanto no gânglio
3 quanto no corno dorsal da medula. Ademais, a expressão da enzima é diminuída
4 pela administração de minociclina, bloqueador da atividade microglial, revelando a
5 interligação da via IDO/KYN e de células gliais (ROJEWSKA et al., 2016). Este
6 achado vai de encontro a outra publicação, na qual o uso de animais nocaute para a
7 produção desta enzima foi protetora em relação ao processo inflamatório induzido
8 pelas quinureninas (HEISLER et al., 2015), algumas das quais (mais
9 especificamente o QUIN e PA) podem estar associados às alterações sensoriais por
10 estimularem a expressão da forma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS,
11 OXENKRUG et al., 2007), cujo produto, quando em excesso, pode promover efeito
12 prónociceptivo (FREIRE et al., 2009). Neste sentido, utilizamos como ferramenta
13 farmacológica o bloqueio desta enzima, em animais diabéticos 4 semanas após o
14 início da patologia, dado o momento de maior expressão da enzima ser neste *time*
15 *point* do diabetes.

16 Verificamos que a inibição de KMO promoveu efeito antinociceptivo (Fig 5.14,
17 Painéis A e B), de forma semelhante a outro recente trabalho com tratamento
18 espinhal com diferentes bloqueadores de KMO (JM-6 e Ro61-6048) (ROJEWSKA et
19 al., 2016). Entretanto, o efeito antinociceptivo de JM-6 necessita de metabolismo de
20 primeira passagem para a formação de Ro61-8048, a forma ativa do bloqueador de
21 KMO (ZWILLING et al., 2011). Provavelmente, o metabolismo hepático deficitário no
22 diabetes possa ter contribuído para o fato de que a maior dose de JM-6 não tenha
23 oferecido efeito similar às demais doses (Fig 5.14, Painel A), embora a análise do
24 efeito cumulativo do tratamento (AUC) tenha revelado antinocicepção para todas as
25 doses utilizadas (Fig 5.14, Painel B). Acredita-se que o bloqueio de KMO possua
26 ação neuroprotetora *in vivo* devido ao aumento da produção de KYNA por meio da
27 ação da KAT (quinurenina aminotransferase), além de reduzir sinapses excitatórias
28 (ROJEWSKA et al., 2016; SCHWARCZ et al., 2012; MORONI et al., 2005), bloqueio
29 este presente inclusive na prática clínica (CAMPBELL et al., 2014). Ademais, foi
30 verificado que o aumento de KYNA possui efeito antinociceptivo em animais com
31 ligadura de nervo espinhal (Vécsei et al., 2013), havendo a possibilidade de
32 agonismo sobre receptores GPR35 estar associado a este efeito (COSI et al., 2011).
33 Contudo, estudo prévio indicou que a administração de QUIN estaria associado à
34 analgesia quando utilizado o modelo de retirada da cauda (*tail flick*), pela ação sobre
35 receptores NMDA na PAG (HEYLIGER et al., 1998). Com relação ao diabetes,

1 diferentes metabólitos da via das KYN podem estar associados, como o XA (ácido
2 xanturênico), produto indireto da KMO, o qual acredita-se estar ligado à resistência à
3 insulina (OXENKRUG et al., 2013), além de ser excretado em altos níveis por estes
4 pacientes (ROSEN et al., 1955). Ademais, no soro de pacientes com DM tipo 2,
5 níveis elevados de IDO1, KMO, KNYU e KAT foram encontrados (FAVANNEC et al.,
6 2015).

7 Dada a maior permeabilidade da barreira hemato encefálica no diabetes
8 (HAWKINS et al., 2007), associada à maior produção periférica de quinureninas,
9 transportadas através desta barreira (KITA et al., 2002), é possível inferir que a
10 produção de QUIN esteja aumentada no diabetes, atuando sobre receptores NMDA
11 centrais. Deste modo, observamos antinocicepção quando administrado i.t. o
12 antagonista de receptores NMDA, MK-801 (Fig 5.15, Painéis A e B), já que todas as
13 doses evocaram aumento no limiar mecânico. Uma das bem descritas alterações
14 neuronais que ocorrem no estado diabético e que também acredita-se que tenha
15 papel na sensibilização central é o aumento de receptores NMDA no DH (BAI et al.,
16 2014), assim como a fosforilação destes receptores (RONDÓN et al., 2010) e a
17 expressão de subunidades com afinidade aumentada pelo glutamato (NR2a and
18 NR2B) (TOMIYAMA et al., 2005). Ademais, o glutamato aumentado na medula de
19 animais Dbt está relacionado à facilitação do estado hiperalgésico (MALCANGIO;
20 THOMLINSON 1998), assim como ocorre em modelo de DM tipo 2 (DAUCH et al.,
21 2012). Neste sentido, o uso de MK-801, um antagonista NMDA apresentou efeito
22 antinociceptivo quando utilizado sistemicamente (MALCANGIO; THOMLINSON,
23 1998) ou localmente (MERT et al., 2014). Já pacientes com enxaqueca
24 possuem menor quantidade de KYNA no soro, suportando a ideia de que receptores
25 NMDA possam estar superativados em pacientes com dor crônica (CURTO et al.,
26 2015). Entretanto, mais estudos são necessários para averiguar a veracidade de tal
27 hipótese.

28 Zhou e colaboradores apontaram a falta de estudos pré clínicos relacionando
29 o papel da IDO1 com a dor (ZHOU et al., 2015), de modo que devido à
30 complexidade do diabetes e de suas complicações relacionadas, diferentes vias
31 podem estar co-ocorrendo e contribuindo de formas diferentes para a patologia.
32 Assim, não é possível negar o possível papel da via IDO1/KYN e suas correlatas
33 (IDO2/TDO) na formação de KYN e na depleção de serotonina, assim como já
34 verificado em outras patologias (WU et al., 2013; SCHWARCZ et al., 2012). Não
35 obstante, é possível que, dependendo da etiologia da dor crônica, haja sensibilidade

1 diferencial aos metabólitos do Trp, uma vez que os aferentes primários, por exemplo,
2 respondem diferentemente dependendo do tipo de lesão que acomete o sistema
3 nervoso (ABRAHAMSEN et al., 2008).

4 Embora nossos dados apontem para a possibilidade da redução do estado
5 inflamatório no diabetes, e que este poderia estar em parte influenciando as
6 atividade das enzimas IDO1 e KMO, uma vez que estas são positivamente
7 modulada por citocinas pró-inflamatórias, a ausência de diferença pode estar
8 relacionada à morte de células gliais no estado hiperglicêmico. Embora a via das
9 KYN possa ser igualmente mediada por outras enzimas correlatas IDO2 e TDO, sua
10 participação provavelmente é menor neste contexto, dada a menor atividade
11 enzimática de IDO2 de forma geral (BALL et al., 2007) e o fato de que TDO e IDO1
12 não podem estar paralelamente ativadas (HAYAISHI, 1976). Ademais, o efeito
13 antinociceptivo observado após o tratamento com 1-L-MT reforça a hipótese de que
14 a IDO1 seja mais importante uma vez que a TDO não pode ser bloqueada por 1-MT
15 (MULLER et al., 2005). Para diferenciar o efeito de cada uma sobre a ativação da via
16 de produção de KYN seria necessária a dosagem de neopterina, um marcador
17 presente em pacientes com câncer e que possui base de formação bioquímica
18 idêntica à de estimulação da IDO (SUCHER et al., 2010). Entretanto, tal hipótese
19 acerca do papel das diferentes isoformas funcionais de IDO1, assim como dos
20 metabólitos da via, necessita de maiores investigações, especialmente com relação
21 aos quadros de dor crônica, para os quais há deficiência de estudos sobre a
22 participação da via. A formação de KYN é sabidamente dependente de outras
23 enzimas *downstream* além de IDO1 (GROHMANN et al., 2003), as quais podem ser
24 moduladas pelo estado diabético, contexto ainda pouco explorado.

25

26 **7. CONCLUSÕES**

27 A partir dos dados obtidos em nosso estudo, é possível concluir que de modo
28 consistente com a literatura, animais diabéticos induzidos quimicamente por
29 estreptozotocina (STZ) apresentam alodinia mecânica, alteração sensorial
30 possivelmente associada à desregulação do tônus descendente inibitório
31 serotoninérgico. Tal desbalanço seria causado não somente pela redução dos níveis
32 de serotonina, mas também do aumento da degradação desta amina na medula de
33 animais diabéticos, visto que o tratamento de reposição com inibidor da recaptção

1 deste neurotransmissor promoveu efeito antinociceptivo nestes animais. A
2 desregulação serotoninérgica pode ainda estar associada à ativação da via indolamina
3 2,3-dioxigenase (IDO), via com papel na depleção de triptofano e redução de
4 sinapses serotoninérgicas, uma vez que o bloqueio farmacológico de IDO1 quanto de
5 KMO, enzimas passo-limitantes da via, promoveram antinocicepção em animais
6 diabéticos. Verificamos que o quadro diabético não induziu mudanças na expressão
7 de ambas as enzimas, o que pode ser explicado não somente pelo menor tônus pró
8 inflamatório, mas também pela ausência de ativação da população glial. Por fim,
9 sabendo-se que a via IDO1 também é responsável pela produção de metabólitos
10 com atividade neurotóxica por meio do agonismo de receptores NMDA, observamos
11 que a manipulação indireta da via pelo bloqueio de tais receptores promove também
12 efeito antinociceptivo. Assim, é possível afirmar que a via IDO1/KYN pode ser um
13 alvo no manejo da DND, especialmente se utilizada em conjunto com drogas que
14 atuem na modulação descendente, visto que pacientes diabéticos podem ser mais
15 beneficiados deste tipo de terapêutica.

16

8.REFERÊNCIAS

ABBOTT, N.J. Astrocyte-endothelial interactions and the blood brain barrier permeability. **J Anat**, 200:629–638, 2002.

ABRAHAMSEN, B.; ZHAO, J.; ASANTE, C.O.; CENDAN, C.M.; MARSH, S.; MARTINEZ-BARBERA, J.P.; NASSAR, M.A.; DICKENSON, A.H.; WOOD, J.N. The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. **Science**, 321, 702–705, 2008.

AFSARI, Z.H.; RENNO, W.M.; ABD-EL-BASSET, E. Alteration of glial fibrillary acidic proteins immunoreactivity in astrocytes of the spinal cord diabetic rats. **Anat Rec (Hoboken)**, 291(4):390-9, 2008.

AIZENMAN, Y.; DE VELLIS, J.; Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. **Brain Res**, 414:301–308, 1987.

ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P.Z.; Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med**, 15(7):539-53, 1998.

ALEXANDER, G.M.; REICHENBERGER, E.; PETERLIN, B.L.; PERREAULT, M.J.; GROTHUSEN, J.R.; SCHWARTZMAN, R.J. Plasma amino acids changes in complex regional pain syndrome. **Pain Res. Treat**, 742407, 2013.

ANDRZEJEWSKA-BUCZKO, J.; PAWLAK, D.; TANKIEWICZ, A.; MATYS, T.; BUCZKO, W. Possible involvement of kynurenamines in the pathogenesis of cataract in diabetic patients. **Med Sci Monit**, 7(4):742-5, 2001.

ANJANEYULU, M.; CHOPRA, K. Fluoxetine attenuates thermal hyperalgesia through 5-HT_{1/2} receptors in streptozotocin-induced diabetic mice. **Eur J Pharmacol**, 497(3):285-92, 2004.

ARUMUGGAM, N.; BHOWMICK, N.A.; RUPASINGHE, H.P. A Review: Phytochemicals Targeting JAK/STAT Signaling and IDO Expression in Cancer. **Phytother Res**, 29(6):805-17, 2015.

BABAN, B.; LIU, J.Y.; MOZAFFARI, M.S. Endoplasmic reticulum stress response and inflammatory cytokines in type 2 diabetic nephropathy: role of indolamine 2,3-dioxygenase and programmed death-1. **Exp Mol Pathol**, 94(2):343-51, 2013.

BALL, H.J.; SANCHEZ-PEREZ, A.; WEISER, S.; AUSTIN, C.J.; ASTELBAUER, F.; MIU, J.; MCQUILLAN, J.A.; STOCKER, R.; JERMIIN, L.S.; HUNT, N.H. Characterization of an indolamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. **Gene**, 396(1):203-13, 2007.

BANNISTER, K.; PATEL, R.; GONCALVES, L.; TOWNSON, L.; DICKENSON, A.H. Diffuse noxious inhibitory controls and nerve injury: restoring an imbalance between descending monoamine inhibitions and facilitations. **Pain**, 156(9):1803-11, 2015.

BAI, HP.; LIU, P.; WU, Y.M.; GUO, WY.; GUO, Y.X.; WANG, X.L. Activation of spinal GABAB receptors normalizes N-methyl-D-aspartate receptor in diabetic neuropathy. **J Neurol Sci**, 341: 68-72, 2014.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; DI CESARE MANNELLI, L.; ZANARDELLI, M.; MICHELI, L.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; GHELARDINI, C. Serotonergic modulation in neuropathy induced by oxaliplatin: effect on the 5HT_{2C} receptor. **Eur J Pharmacol**, 735:141-9, 2014.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **Lancet Neurol**, 9:807e819, 2010.

BARRETT, A.M.; LUCERO, M.A.; LE, T.; ROBINSON, R.L.; DWORKIN, R.H.; CHAPPELL, A.S. Epidemiology, public health burden, and treatment of diabetic peripheral neuropathic pain: a review. **Pain Med**, Suppl 2:S50-62, 2007. Review.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, 139(2):267-84, 2009. Review.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu Rev Neurosci**, 7:309-38, 1984.

BAYDAS, G.; REITER, R.J.; YASAR, A.; TUZCU, M.; AKDEMIR, I.; NEDZVETSKII, V.S. Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Free Radic Biol Med**, 35(7):797-804, 2003.

BERGER, E.; SOCHETT, E.B.; PEIRONE, A.; PARIKH, A.; DANEMAN, D. Cardiac and vascular function in adolescents and young adults with type 1 diabetes. **Diabetes Technol Ther**, 6(2):129-35, 2004.

BHATTACHARYA, A.; WICKENDEN, A.D.; CHAPLAN, S.R. Sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. **Neurotherapeutics**, 6(4):663-78, 2009. Review.

BIAN, D.; OSSIPOV, M.H.; ZHONG, C.; MALAN, T.P.; JR, PORRECA, F. Tactile allodynia, but not thermal hyperalgesia, of the hindlimbs is blocked by spinal transection in rats with nerve injury. **Neurosci Lett**, ;241(2-3):79-82, 1998.

BOUHASSIRA, D.; WILHELM, S.; SCHACHT, A.; PERROT, S.; KOSEK, E.; CRUCCU, G.; FREYNHAGEN, R.; TESFAYE, S.; LLEDÓ, A.; CHOY, E.; MARCHETTINI, P.; MICÓ, J.A.; SPAETH, M.; SKLJAREVSKI, V.; TÖLLE, T. Neuropathic pain phenotyping as a predictor of treatment response in painful diabetic neuropathy: data from the randomized, double-blind, COMBO-DN study. **Pain**, 155(10):2171-9, 2014.

BOULTON, A.J.; GRIES, F.A.; JERVELL, J.A. Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabet Med**, 15(6):508-14, 1998.

BOULTON, A.J.; KIRSNER, R.S.; VILEIKYTE L. Clinical practice. Neuropathic diabetic foot ulcers. **N Engl J Med**, 351: 48-55, 2004.

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

BOYLE, J.; ERIKSSON, M.E.; GRIBBLE, L.; GOUNI, R.; JOHNSEN, S.; COPPINI, DV.; KERR, D. Randomized, placebo-controlled comparison of amitriptyline, duloxetine, and pregabalin in patients with chronic diabetic peripheral neuropathic pain: impact on pain, polysomnographic sleep, daytime functioning, and quality of life. **Diabetes Care**, 35(12):2451-8, 2012.

BYRNE, F.M.; CHEETHAM, S.; VICKERS, S.; CHAPMAN, V. Characterisation of pain responses in the high fat diet/streptozotocin model of diabetes and the analgesic effects of antidiabetic treatments. **J Diabetes Res**, 2015:752481, 2015.

CADY, S.G.; SONO, M. 1-Methyl-dl-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)- dl-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]- dl-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indolamine 2,3-dioxygenase. **Arch. Biochem. Biophys.** 291, 326–333, 1991.

CALCUTT, N.A. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. **Int. Rev. Neurobiol.** 50, 205, 2002.

CAMPBELL, B.M.; CHARYCH, E.; LEE, A.W.; MÖLLER, T. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. **Front Neurosci**, 6;8:12, 2014.

CATHOMAS, F.; FUERTIG, R.; SIGRIST, H.; NEWMAN, G.N.; HOOP, V.; BIZZOZZERO, M.; MUELLER, A.; LUIPPOLD, A.; CECI, A.; HENGERER, B.; SEIFRITZ, E.; FONTANA, A.; PRYCE CR. CD40-TNF activation in mice induces extended sickness behavior syndrome co-incident with but not dependent on activation of the kynurenine pathway. **Brain Behav Immun.** 2015 Nov;50:125-40.

CEGIELSKA-PERUN K, BUJALSKA-ZADROZNY M, GASINSKA E, MAKULSKA-NOWAK HE. Enhancement of antinociceptive effect of morphine by antidepressants in diabetic neuropathic pain model. **Pharmacol Rep**, 66(2):228-34, 2014.

CERVANTES-DURÁN, C.; ROCHA-GONZÁLEZ, H.I.; GRANADOS-SOTO, V. Peripheral and spinal 5-HT receptors participate in the pronociceptive and antinociceptive effects of fluoxetine in rats. **Neuroscience**, 12;252:396-409, 2013.

CHAN, A.W.; MACFARLANE, I.A.; BOWSHER, D. Short term fluctuations in blood glucose concentrations do not alter pain perception in diabetic-patients with and without painful peripheral neuropathy. **Diabetes Res**, 14(1):15-9, 1990.

CHAUHAN, N.; TALIYAN, R.; SHARMA, P.L. Effect of dipyrrone and thalidomide alone and in combination on STZ-induced diabetic neuropathic pain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 385(5):527-38, 2012.

CHEN, S.R.; PAN, H.L. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. **J Neurophysiol**, 87(6):2726-33, 2002.

CHENG, K.I.; WANG, H.C.; CHUANG, Y.T.; CHOU, C.W.; TU, H.P.; YU, Y.C.; CHANG, L.L.; LAI, C.S. Persistent mechanical allodynia positively correlates with an increase in activated microglia and increased P-p38 mitogen-activated protein kinase activation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur J Pain**, 18(2):162-73, 2014.

CHENG, C.W.; SHIEH, P.C.; LIN, Y.C.; CHEN, Y.J.; LIN, Y.H.; KUO, D.H.; LIU, J.Y.; KAO, J.Y.; KAO, M.C.; WAY, T.D. Indolamine 2,3-dioxygenase, an immunomodulatory protein, is suppressed by (-)-epigallocatechin-3-gallate via blocking of gamma-interferon-induced JAK-PKC-delta-STAT1 signaling in human oral cancer cells. **J Agric Food Chem**, 58(2):887-94, 2010.

CLEARY, D.R.; NEUBERT, M.J.; HEINRICHER, M.M. Are opioid-sensitive neurons in the rostral ventromedial medulla inhibitory interneurons? **Neuroscience**, 151(2):564-71, 2008.

COLEMAN, E.; JUDD, R.; HOE, L.; DENNIS, J.; POSNER, P. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. **Glia**, 48(2):166-78, 2004.

COMMISSIONG, JW. Monoamine metabolites: their relationship and lack of relationship to monoaminergic neuronal activity. **Biochem Pharmacol**, 34(8):1127-31, 1985.

COSI, C.; MANNAIONI, G.; COZZI, A.; CARLÀ, V.; SILI, M.; CAVONE, L.; MARATEA, D.; MORONI, F. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. **Neuropharmacology**, 60(7-8):1227-31, 2011.

CUNHA, J.M.; FUNEZ, M.I.; CUNHA, F.Q.; PARADA, CA.; FERREIRA, S.H.; Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia. **Braz J Med Biol Res**, 42(2):197-206, 2009.

CURTO, M.; LIONETTO, L.; NEGRO, A, CAPI, M.; PERUGINO, F.; FAZIO, F.; GIAMBERARDINO, M.A.; SIMMACO, M.; NICOLETTI, F.; MARTELLETTI, P. Altered serum levels of kynurenine metabolites in patients affected by cluster headache. **J Headache Pain**, 17(1):27, 2015.

DA SILVA DIAS, I.C.; CARABELLI, B.; ISHII, D.K.; DE MORAIS, H.; DE CARVALHO, M.C.; RIZZO DE SOUZA, L.E.; ZANATA, S.M.; BRANDÃO, M.L.; CUNHA, T.M.; FERRAZ, A.C.; CUNHA, J.M.; ZANOVELI, J.M. Indolamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. **Mol Neurobiol**, 15, 2015.

DAULHAC, L.; MALLET, C.; COURTEIX, C.; ETIENNE, M.; DUROUX, E.; PRIVAT, A.M.; ESCHALIER, A.; FIALIP, J. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. **Mol Pharmacol**,70(4):1246-54, 2006.

DAI, X.; ZHU, B.T. Indolamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. **J Histochem Cytochem**, 58(1):17-28, 2010.

DAUCH, J.R.; YANIK, B.M.; HSIEH, W.; OH, S.S.; CHENG, H.T. Neuron-astrocyte signaling network in spinal cord dorsal horn mediates painful neuropathy of type 2 diabetes. **Glia**, 60(9):1301-15, 2012.

DCCT RESEARCH GROUP. The effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy. **Annals of Internal Medicine**, 122, (8), 561 – 568, 1995.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2015. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Itapevi, 3ª ed., p. 9 – 20, 2015

DOBRETISOV, M.; HASTINGS, S.L.; ROMANOVSKY, D.; STIMERS, J.R.; ZHANG, J.M. Mechanical hyperalgesia in rat models of systemic and local hyperglycemia. **Brain Res**, 960(1-2):174-83, 2003.

DOXEY, D.L.; NARES, S.; PARK, B.; TRIEU, C.; CUTLER, C.W.; IACOPINO, A.M. Diabetes-induced impairment of macrophage cytokine release in a rat model: potential role of serum lipids. **Life Sci**, 63(13):1127-36, 1998.

DREL, V.R.; PACHER, P.; VARENIUK, I.; PAVLOV, I.; ILNYTSKA, O.; LYZOGUBOV, V.V.; TIBREWALA, J.; GROVES, J.T.; OBROSOVA, I.G. A peroxynitrite decomposition catalyst counteracts sensory neuropathy in streptozotocin-diabetic mice. **Eur J Pharmacol**, 569(1-2):48-58, 2007.

DYCK, P.J.; DAVIES, J.L.; WILSON, D.M.; SERVICE, F.J.; MELTON, L.J. 3RD.; O'BRIEN, P.C. Risk factors for severity of diabetic polyneuropathy: intensive longitudinal assessment of the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. **Diabetes Care**, 22(9):1479-86, 1999.

DWORKIN, R.H. Mechanism-based treatment of pain. **Pain**, 153(11):2300, 2012.

ENG, L.F.; GHIRNIKAR, R.S.; LEE, Y.L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res**, (9-10):1439-51, 2000. Review.

EZZELDIN, E.; SOUROR, W.A.; EL-NAHHAS, T.; SOUDI, A.N.; SHAHAT, A.A. Biochemical and neurotransmitters changes associated with tramadol in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Biomed Res Int**, 2014:238780, 2014.

FAVENNEC, M.; HENNART, B.; CAIAZZO, R.; LELOIRE, A.; YENGO, L.; VERBANCK M, et al. The kynurenine pathway is activated in human obesity and shifted toward kynurenine monooxygenase activation. **Obesity (Silver Spring)**, ;23(10):2066-74, 2015.

FERNSTROM, M.H.; FERNSTROM, J.D. Large changes in serum free tryptophan levels do not alter brain tryptophan levels: studies in streptozotocin-diabetic rats. **Life Sci**, ;52(11):907-16, 1993.

FIELDS, H.L.; BRY, J.; HENTALL, I.; ZORMAN, G. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. **J Neurosci**, 3(12):2545-52, 1983.

FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu Rev Neurosci**, 14:219-45, 1991.

FINNERUP, N.B.; SINDRUP, S.H.; JENSEN, T.S. Management of painful neuropathies. **Handb Clin Neurol**, 115:279-90, 2013.

FREEMAN, R. New and developing drugs for the treatment of neuropathic pain in diabetes. **Curr Diab Rep**, 13(4):500-8, 2013.

FREIRE, M.A.; GUIMARÃES, J.S.; LEAL, W.G.; PEREIRA, A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. **Front Neurosci**, 3(2):175-81, 2009.

FOX, A.; EASTWOOD, C.; GENTRY, C.; MANNING, D.; URBAN L. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. **Pain**, 81(3): 307–316, 1999.

FUJIGAKI, H.; SAITO, K.; FUJIGAKI, S.; TAKEMURA, M.; SUDO, K.; ISHIGURO, H.; SEISHIMA, M. The signal transducer and activator of transcription 1 α and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. **J Biochem**, 139(4):655-62, 2006.

GABBAY, K.H. The Sorbitol Pathway and the Complications of Diabetes. **N Engl J Med**, 288,(16), 831 – 836, 1973.

GEBHART, G.F. Descending modulation of pain. **Neurosci Biobehav Rev**, 27(8):729-37, 2004. Review.

GILRON, I.; BAILEY, J.M.; TU, D.; HOLDEN, R.R, WEAVER, D.F, HOUDEN, R.L. Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. **N Engl J Med**, 352(13):1324-34, 2005.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends Immunol**, 24(5):242-8, 2003.

GUILLEMIN, G.J.; CULLEN, K.M.; LIM, C.K.; SMYTHE, G.A.; GARNER, B.; KAPOOR V.; TAKIKAWA, O.; BREW, B.J. Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. **J Neurosci**, 27(47):12884-92, 2007.

HANANI, M.; BLUM, E.; LIU, S.; PENG, L.; LIANG, S. Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in streptozotocin-treated rodents. **J Cell Mol Med.**, 18(12):2367-71, 2014.

HAYAISHI, O. Properties and function of indolamine 2,3-dioxygenase. **J Biochem**, 79(4):13P-21P, 1976.

HAWKINS, B.T.; LUNDEEN, T.F.; NORWOOD, K.M.; BROOKS, H.L.; EGLENTON, R.F. Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. **Diabetologia** 50: 202–211, 2007.

HEINRICHER, M.M.; CHENG, Z.F.; FIELDS, H.L. Evidence for two classes of nociceptive modulating neurons in the periaqueductal gray. **J Neurosci**, 7(1):271-8, 1987.

HEISLER, J.M.; O'CONNOR, J.C. Indolamine 2,3-dioxygenase-dependent neurotoxic kynurenine metabolism mediates inflammation-induced deficit in recognition memory. **Brain Behav Immun**, 50:115-24, 2015

HENLEY, W.N.; BELLUSH, L.L.; TRESSLER, M. Bulbospinal serotonergic activity during changes in thyroid status. **Can J Physiol Pharmacol**, 76(12):1120-31, 1998.

HENLEY, W.N.; BELLUSH, L.L. Streptozotocin-induced decreases in serotonin turnover are prevented by thyroidectomy. **Neuroendocrinology**, 56(3):354-63, 1992.

HERRERA. R.; MANJARREZ, G.; HERNANDEZ, J. Inhibition and kinetic changes of brain tryptophan-5-hydroxylase during insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. **Nutr Neurosci**, 8(1):57-62, 2005.

HEYLIGER, S.O.; GOODMAN, C.B.; NGONG, J.M.; SOLIMAN K.F. The analgesic effects of tryptophan and its metabolites in the rat. **Pharmacol Res**, 38(4):243-50, 1998.

HIRATA, F.; NOMIYAMA, S.; HAYAISHI, O. Indolamine 2,3-dioxygenase. Note I. Catalytic and molecular properties. **Acta Vitaminol Enzymol**, 29(1-6):288-90, 1975.

HOLZER, S.E.; CAMEROTA, A.; MARTENS, L.; CUERDON, T.; CRYSTAL-PETERS, J.; ZAGARI, M. Costs and duration of care for lower extremity ulcers in patients with diabetes. **Clin Ther**. Erratum in: **Clin Ther**, ;20(2):373, 1998.

HU, P.; THINSCHMIDT, J.S.; CABALLERO, S.; ADAMSON, S.; COLE, L.; CHAN-LING, T.; GRANT, M.B. Loss of survival factors and activation of inflammatory cascades in brain sympathetic centers in type 1 diabetic mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 308(8):E688-98, 2015.

(a) HUANG ZX, LU ZJ, MA WQ, WU FX, ZHANG YQ, YU WF, ZHAO ZQ. Involvement of RVM-expressed P2X7 receptor in bone cancer pain: mechanism of descending facilitation. **Pain**,155(4):783-91, 2014.

(b) 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. **Neurochem Int**, 75:112-9, 2014.

HUANG L, OU R, RABELO DE SOUZA G, CUNHA TM, LEMOS H, MOHAMED E, LI L, PACHOLCZYK G, RANDALL J, MUNN DH, MELLOR AL. Virus Infections Incite Pain Hypersensitivity by Inducing Indolamine 2,3 Dioxygenase. **PLoS Pathog**, 12(5):e1005615, 2016.

International Diabetes Federation Atlas, 2015, disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em 10 Fev 2016.

JACKMAN, K.A.; BRAIT, V.H.; WANG, Y.; MAGHZAL, G.J.; BALL, H.J.; MCKENZIE, G.; DE SILVA, TM.; STOCKER, R.; SOBEY, C.G. Vascular expression, activity and function of indolamine 2,3-dioxygenase-1 following cerebral ischaemia-reperfusion in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 383(5):471-81, 2011.

JANN MW, SLADE JH. Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression. **Pharmacotherapy**, 27(11):1571-87, 2007. Review.

JAVED, S.; PETROPOULOS, I.N.; ALAM, U.; MALIK, R.A. Treatment of painful diabetic neuropathy. **Ther Adv Chronic Dis**, 6(1):15-28, 2015.

KANTH, V.R.; LAVANYA, K.; SRINIVAS, J.; RAJU, T.N. Elevated Expression of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) and accumulation of kynurenic acid in the pathogenesis of STZ-induced diabetic cataract in Wistar rats. **Curr Eye Res**, 34(4):274-81, 2009.

KAPUR, D. Neuropathic pain and diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, Suppl 1:S9-15, 2003.

KATO, T.; KAJIYAMA, S.; HAMADA H.; KAWAMOTO, M. Long-term administration of fluvoxamine attenuates neuropathic pain and involvement of spinal serotonin receptors in diabetic model rats. Hiroshima **J Med Sci**, 62(4):83-9, 2013.

KESIC, M.; TVRDEIC, A.; KOLARIC, D.; STOJKOVIC, R.; CICIN-SAIN, L. Serotonergic modulation of pain and analgesic responses: a study in rats with constitutionally altered serotonin transporters. **Eur J Pain**, 19(4):508-15, 2015.

KIM, H.; CHEN, L.; LIM, G.; SUNG, B.; WANG, S.; MCCABE, M.F.; RUSANESCU, G.; YANG, L.; TIAN, Y.; MAO, J. Brain indolamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. **J Clin Invest**, 122(8):2940-54, 2012.

KITA, T.; MORRISON, P.F.; HEYES, M.P.; MARKEY, S.P. Effects of systemic and central nervous system localized inflammation on the contributions of metabolic precursors to the L-kynurenine and quinolinic acid pools in brain. **J. Neurochem.** 82, 258–268, 2002.

KLEINBERGER, J.W.; POLLIN, T.I. Personalized medicine in diabetes mellitus: current opportunities and future prospects. **Ann N Y Acad Sci**, 1346(1):45-56, 2015.

KRISHNAN, A.V.; LIN, C.S.Y.; KIERNAN, M.C. Activity-dependent excitability changes suggest Na⁺/K⁺pump dysfunction in diabetic neuropathy. **Brain**, 131, 1209 – 1216, 2008.

KUDO, Y.; BOYD, C.A. Characterisation of l-tryptophan transporters in human placenta: a comparison of brush border and basal membrane vesicles. **J. Physiol.** 531, 405–416, 2001.

KUMAR, P.; RAO, G.N.; PAL, B.B.; PAL, A. Hyperglycemia-induced oxidative stress induces apoptosis by inhibiting PI3-kinase/Akt and ERK1/2 MAPK mediated signaling

pathway causing downregulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in glial cells. **Int J Biochem Cell Biol**, 53:302-19, 2014.

KWON, M.; ALTIN, M.; DUENAS, H.; ALEV, L. The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. **Pain Pract**, 14(7):656-67, 2014.

LAU, B.K.; VAUGHAN, C.W. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. **Curr Opin Neurobiol**, 29:159-64, 2014.

LAWRENCE, J.M.; CONTRERAS, R.; CHEN, W.; SACKS, D.A. Trends in the prevalence of preexisting diabetes and gestational diabetes mellitus among a racially/ethnically diverse population of pregnant women, 1999-2005. **Diabetes Care**, 31(5), 899 – 904, 2008.

LEKLEM, J.E. Quantitative aspects of tryptophan metabolism in humans and other species: a review. **Am. J. Clin. Nutr.** 24, 659–672, 1971.

LIAO, Y.H.; ZHANG, G.H.; JIA, D.; WANG, P.; QIAN, N.S.; HE, F.; ZENG, X.T, HE, Y.; YANG, Y.L.; CAO, D.Y.; ZHANG, Y.; WANG, DS.; TAO, KS.; GAO, C.J.; DOU, K.F. Spinal astrocytic activation contributes to mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes. **Brain Res**, 12;1368:324-35, 2011.

LIOU, J.T.; LIU, F.C.; MAO, C.C.; LAI, Y.S.; DAY, Y.J. Inflammation confers dual effects on nociceptive processing in chronic neuropathic pain model. **Anesthesiology**, 114(3):660-72, 2011.

LIU, J.J.; RAYNAL, S.; BAILBÉ, D.; GAUSSERES, B.; CARBONNE, C.; AUTIER, V.; MOVASSAT, J.; KERGOAT, M.; PORTHA, B. Expression of the kynurenine pathway enzymes in the pancreatic islet cells. Activation by cytokines and glucolipototoxicity. **Biochim Biophys Acta**, 1852(5):980-91, 2015.

LÖB, S.; KÖNIGSRAINER, A.; RAMMENSEE, H.G.; OPELZ, G.; TERNESS, P. Inhibitors of indolamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? **Nat Rev Cancer**, 9(6):445-52, 2009. Review.

LV, S.L.; FANG, C.; HU J.; HUANG, Y.; YANG, B.; ZOU, R.; WANG, F.Y.; ZHAO, H.Q. Assessment of Peripheral Neuropathy Using Measurement of the Current

Perception Threshold with the Neurometer® in patients with type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, 109(1):130-4, 2015.

MAES, M.; GALECKI, P.; VERKERK, R.; RIEF, W. Somatization, but not depression, is characterized by disorders in the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, indicating increased indolamine 2,3-dioxygenase and lowered kynurenine aminotransferase activity. **Neuro Endocrinol Lett**, 32(3):264-73, 2011.

MALCANGIO, M.; TOMLINSON, D.R. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. **Pain**, 76(1-2):151-7, 1998.

MAGRINELLI, F.; BRIANI, C.; ROMANO, M.; RUGGERO, S.; TOFFANIN, E.; TRIOLO, G.; PETER, G.C.; PRAITANO, M.; LAURIOLA, M.F.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. The Association between Serum Cytokines and Damage to Large and Small Nerve Fibers in Diabetic Peripheral Neuropathy. **J Diabetes Res**, 2015:547834, 2015.

MANJARREZ-GUTIÉRREZ, G.; ROCÍO HERRERA-MÁRQUEZ, JR.; BUENO-SANTOYO, S.; GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M.; HERNÁNDEZ, J. Changes in brain serotonin biosynthesis in rats with diabetes mellitus induced by streptozocin: effect of insulin treatment. **Rev Invest Clin**, 52(5):509-16, 2000.

MANTYH, P.W. Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey. II. Descending efferent projections. **J Neurophysiol**, 49(3):582-94, 1983.

MARUYAMA, K.; ASAI, J.; II, M.; THORNE, T.; LOSORDO, D.W.; D'AMORE, P.A. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. **Am J Pathol**, 170(4):1178-91, 2007.

MELLOR, A.L.; MUNN, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nat. Rev. Immunol**, 4 (10), 762–774, 2004.

MERT, T.; OKSUZ, H.; TUGTAG, B.; KILINC, M.; SENOGLU, N.; BILGIN, R. Modulating actions of NMDA receptors on pronociceptive effects of locally injected remifentanil in diabetic rats. **Pharmacol Rep**, 66(6):1065-72, 2014.

METZ, R.; DUHADAWAY, J.B.; KAMASANI, U.; LAURY-KLEINTOP, L.; MULLER, A.J.; PRENDERGAST, G.C. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the

preferred biochemical target of the antitumor indolamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. **Cancer Res**, 67(15):7082-7, 2007.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. v. 57, n. 1, p. 1 – 164, 1998.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, 66(6):355-474, 2002.

MILLIGAN, E.D.; WATKINS, L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, 10(1):23-36, 2009. Review.

MONHEMIUS, R.; GREEN, D.L.; ROBERTS, M.H.; AZAMI, J. Periaqueductal grey mediated inhibition of responses to noxious stimulation is dynamically activated in a rat model of neuropathic pain. **Neurosci Lett**, 298(1):70-4, 2001.

MORLEY, G.K.; MOORADIAN, A.D.; LEVINE, A.S.; MORLEY, J.E. Mechanism of pain in diabetic peripheral neuropathy. Effect of glucose on pain perception in humans. **Am J Med**, 77(1):79-82, 1984.

MORGADO, C.; SILVA, L.; PEREIRA-TERRA, P.; TAVARES, I. Changes in serotonergic and noradrenergic descending pain pathways during painful diabetic neuropathy: the preventive action of IGF1. **Neurobiol Dis**, 43(1):275-84, 2011.

MORONI F, COZZI A, CARPENDO R, CIPRIANI G, VENERONI O, IZZO E. Kynurenine 3-mono-oxygenase inhibitors reduce glutamate concentration in the extracellular spaces of the basal ganglia but not in those of the cortex or hippocampus. **Neuropharmacology**, 48(6):788-95, 2005.

MUNIPALLY, P.K.; AGRAHARM, S.G.; VALAVALA, V.K.; GUNDAE, S.; TURLAPATI, N.R. Evaluation of indolamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients. **Arch Physiol Biochem**, 117(5):254-8, 2011.

MUNN, D.H.; SHARMA, M.D.; HOU, D.; BABAN, B.; LEE, J.R.; ANTONIA, S.J.; MESSINA, J.L.; CHANDLER, P.; KONI, P.A.; MELLOR, A.L. Expression of indolamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. **J Clin Invest**, 114(2):280-90, 2004.

MUNN, D.H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J.T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S.J.; MARSHALL, B.; BROWN, C.; MELLOR, A.L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, 281(5380):1191-3, 1998.

MURAD, H.; AYUOB, N. Co-Administration of Pioglitazone Improves Fluoxetine's Antinociceptive, Neuroprotective, and Antidepressant Effects in Chronic Constriction Injury in Rats. **Pain Physician**, 18(6):609-20, 2015.

MURAI, N.; AOKI, T.; TAMURA, S.; SEKIZAWA, T.; KAKIMOTO, S.; TSUKAMOTO, M.; OE, T.; ENOMOTO, R.; HAMAKAWA N.; MATSUOKA, N. AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, exerts analgesic effects in a rat model of neuropathic pain with unique characteristics in spinal monoamine turnover. **J Pharmacol Exp Ther**, 348(3):372-82, 2014.

NEGI, G.; SHARMA, S.S. Inhibition of I κ B kinase (IKK) protects against peripheral nerve dysfunction of experimental diabetes. **Mol Neurobiol**, 51(2):591-8, 2015.

NIESTERS, M.; PROTO, P.L.; AARTS, L.; SARTON, E.Y.; DREWES, A.M.; DAHAN, A. Tapentadol potentiates descending pain inhibition in chronic pain patients with diabetic polyneuropathy. **Br J Anaesth**, 113(1):148-56, 2014.

NORDEN, D.M.; TROJANOWSKI, P.J.; VILLANUEVA, E.; NAVARRO, E.; GODBOUT, J.P. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. **Glia**, 64(2):300-16, 2016.

OBROSOVA, I.G.; XU, W.; LYZOGUBOV, V.V.; ILNYTSKA, O.; MASHTALIR, N.; VARENIUK, I.; PAVLOV, I.A.; ZHANG, J.; SLUSHER, B.; DREL, V.R. PARP inhibition or gene deficiency counteracts intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain in advanced diabetic neuropathy. **Free Radic Biol Med**, 44(6):972-81, 2008.

OXENKRUG, G.F. Genetic and hormonal regulation of tryptophan kynurenine metabolism: implications for vascular cognitive impairment, major depressive disorder, and aging. **Ann N Y Acad Sci**, 1122:35-49, 2007.

OXENKRUG, G.F. Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. **Mol Neurobiol**, 48(2):294-301, 2013.

OXENKRUG, G.F. Increased Plasma Levels of Xanthurenic and Kynurenic Acids in Type 2 Diabetes. **Mol Neurobiol**, 52(2):805-10, 2015.

ÖZ, G.; TESFAYE, N.; KUMAR, A.; DEELCHAND, D.K.; EBERLY, L.E.; SEAQUIST, E.R. Brain glycogen content and metabolism in subjects with type 1 diabetes and hypoglycemia unawareness. **J Cereb Blood Flow Metab**, 32(2):256-63, 2012.

PAULUS, W.; TRENKWALDER, C. Less is more: pathophysiology of dopaminergic-therapy-related augmentation in restless legs syndrome. **Lancet Neurol**, 5:878–886, 2006.

PAULSON, P.E.; WILEY, J.W.; MORROW, T.J. Concurrent activation of the somatosensory forebrain and deactivation of periaqueductal gray associated with diabetes-induced neuropathic pain. **Exp Neurol**, 208(2):305-13, 2007.

PERTOVAARA, A.; WEI, H.; KALMARI, J.; RUOTSALAINEN M. Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant properties **Exp Neurol**, 167, 425–434, 2001.

PETERSON, A.C. et al. Evaluation of functionalized tryptophan derivatives and related compounds as competitive inhibitors of indolamine 2,3-dioxygenase. **Med. Chem. Res**, 3, 531–544, 1994.

PETROU, M.; POP-BUSUI, R.; FOERSTER, B.R.; EDDEN, R.A.; CALLAGHAN, B.C.; HARTE, S.E.; HARRIS, R.E.; CLAUW, D.J.; FELDMAN, E.L. Altered excitation-inhibition balance in the brain of patients with diabetic neuropathy. **Acad Radiol**, 19(5):607-12, 2012.

PELTIER, A.; GOUTMAN, S.A.; CALLAGHAN, B.C. Painful diabetic neuropathy. **BMJ**, 348:g1799, 2014. Review. Erratum in: **BMJ**, 348:g3440, 2014.

PICKUP, J.C.; CHUSNEY, G.D.; THOMAS, S.M.; BURT, D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. **Life Sci**, ;67(3):291-300, 2000.

PIEROZAN, P.; FERREIRA, F.; ORTIZ DE LIMA, B.; GONÇALVES FERNANDES, C.; TOTARELLI MONTEFORTE, P.; DE CASTRO MEDAGLIA, N.; BINCOLETTO, C.; SOUBHI SMAILI, S.; PESSOA-PUREUR, R. The phosphorylation status and cytoskeletal remodeling of striatal astrocytes treated with quinolinic acid. **Exp Cell Res**, 322(2):313-23, 2014.

PIGOTT, E.; DUHADAWAY, J.B.; MULLER, A.J.; GILMOUR, S.; PRENDERGAST G.C.; MANDIK-NAYAK, L. 1-Methyl-tryptophan synergizes with methotrexate to alleviate arthritis in a mouse model of arthritis. **Autoimmunity**, 47(6):409-18, 2014.

POLYZOS, K.A.; OVCHINNIKOVA, O.; BERG, M.; BAUMGARTNER, R.; AGARDH, H.; PIRAULT, J.; GISTERÅ, A.; ASSINGER, A.; LAGUNA-FERNANDEZ, A.; BÄCK, M.; HANSSON, G.K.; KETELHUTH, D.F. Inhibition of indolamine 2,3-dioxygenase promotes vascular inflammation and increases atherosclerosis in Apoe^{-/-} mice. **Cardiovasc Res**, 106(2):295-302, 2015.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci**, 25(6):319-25, 2002.

REDIVO, D.D.; SCHREIBER, A.K.; ADAMI, E.R.; RIBEIRO, D.E.; JOCA, S.R.; ZANOVELI, J.M.; CUNHA, J.M. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. **Behav Brain Res**, 298(Pt B):57-64, 2016.

REICHARD, P.; PIHL, M.; ROSENQVIST, U.; SULE, J. Complications in IDDM are caused by elevated blood glucose level: the Stockholm Diabetes Intervention Study (SDIS) at 10-year follow up. **Diabetologia**, 39(12):1483-8, 1996.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, 164(3878):444-5, 1969.

RITNER, H.L., MACHELSKA, H., STEIN, C. Immune system pain and analgesia. in: A.I. BASBAUM, M. BUSHNELL (Eds.) Science Of Pain. **Academic Press**, Oxford; 407–427, 2009.

ROJEWSKA, E.; PIOTROWSKA, A.; MAKUCH, W.; PRZEWLOCKA, B.; MIKA, J. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. **Neuropharmacology**, 102:80-91, 2015.

RONDÓN, L.J.; PRIVAT, A.M.; DAULHAC, L.; DAVIN, N.; MAZUR, A.; FIALIP, J.; ESCHALIER, A.; COURTEIX, C. Magnesium attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain. **J Physiol**, 588(Pt 21):4205-15, 2010.

ROSENBERG, C.J.; WATSON, J.C. Treatment of painful diabetic peripheral neuropathy. **Prosthet Orthot Int**. 39(1):17-28, 2015.

ROSEN, D.A.; MAENGWYN-DAVIES, G.D.; BECKER, B.; STONE, H.H.; FRIEDENWALD, J.S. Xanthurenic acid excretion studies in diabetics with and without retinopathy. **Proc Soc Exp Biol Med**, 88(3):321-3, 1955.

ROTHSTEIN, J.D.; DYKES-HOBERG, M.; PARDO, C.A.; BRISTOL, L.A.; JIN, L.; KUNCI, R.W.; KANAI, Y.; HEDIGER, M.A.; WANG, Y.; SCHIELKE, J.P.; WELTY, D.F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron** 16:675–686, 1996.

SAID, G. Diabetic neuropathy - a review. **Nat Clin Pract Neurol**, 3:331-40, 2007.

SALEH A, CHOWDHURY SK, SMITH DR, BALAKRISHNAN S, TESSLER L, SCHATNER E, BILODEAU A, VAN DER PLOEG R, FERNYHOUGH P. Diabetes impairs an interleukin-1 β -dependent pathway that enhances neurite outgrowth through JAK/STAT3 modulation of mitochondrial bioenergetics in adult sensory neurons. **Mol Brain**. 24;6:45, 2013.

SALINAS, L.E.G.; MARTINS, M.F.D.; SANTOS, A.A.S.; PIRES, O.C.C.; ELTON, P.; IRIMAR, P.; PELÓGIA, N.C.C. Fluoxetine action on acute pain in rats submitted to sciatic nerve constriction. **Revista Dor**, 13(1), 59-64, 2012.

SASAKI, N.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Production of L-tryptophan-derived catabolites in hepatocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur J Nutr**, 48(3):145-53, 2009.

SATOH. J.; YAGIHASHI, S.; TOYOTA, T. The possible role of tumor necrosis factor- α in diabetic polyneuropathy. **Exp Diabetes Res**, 4:65–71, 2003.

SCHWARCZ, R.; BRUNO, J.P.; MUCHOWSKI, P.J.; WU, H.Q. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. **Nat Rev Neurosci**, 13(7):465-77, 2012.

SCHWARCZ, R.; PELLICCIARI, R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. **J Pharmacol Exp Ther**, 303(1):1-10, 2002.

SHAW, K.M.; CUMMINGS, M.H. Diabetes: Chronic complications. **Wiley**, 2ª edição, p. 35 – 53, 2005.

SHEETZ, M.J.; KING, G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. **JAMA**, 288(20):2579-88, 2002.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci**, 10(11):1361-8, 2007, Review.

SICKMANN, H.M, WAAGEPETERSEN, H.S. Effects of diabetes on brain metabolism--is brain glycogen a significant player? **Metab Brain Dis**, 30(1):335-43, 2015

SILVA, M.; AMORIM, D., ALMEIDA, A.; TAVARES, I.; PINTO-RIBEIRO, F.; MORGADO, C. Pronociceptive changes in the activity of rostroventromedial medulla (RVM) pain modulatory cells in the streptozotocin-diabetic rat. **Brain Res Bull**, 96:39-44, 2013.

SIMA, A.A. New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. **Cell Mol Life Sci**, 60(11):2445-64, 2003. Review.

SIMA, A.A.; KAMIYA, H. Diabetic neuropathy differs in type 1 and type 2 diabetes. **Ann N Y Acad Sci**, 1084:235-49, 2006. Review.

SINGH, V.P.; JAIN, N.K.; KULKARNI, S.K. On the antinociceptive effect of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor. **Brain Res**, 915(2):218-26, 2001.

SKUNDRIC, D.S.; LISAK, R.P. Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy: from glucose metabolism to neurodegeneration. **Exp Diabetes Res**, 4(4):303-12, 2003.

SOLIMAN, H.; MEDIAVILLA-VARELA, M.; ANTONIA, S. Indolamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? **Cancer J**, 16(4):354-9, 2010.

SOUNVORAVONG, S.; NAKASHIMA, M.N.; WADA, M.; NAKASHIMA, K. Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine

analgesia in two mice models of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, 484(2-3):217-23, 2004.

STARR, J.M.; WARDLAW, J.; FERGUSON, K.; MACLULLICH, A.; DEARY, I.J.; MARSHALL, I. Increased blood-brain barrier permeability in type II diabetes demonstrated by gadolinium magnetic resonance imaging. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 74:70–76, 2003.

STEINMAN, R.M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature** 449, 419–426, 2007.

STUCKY, C.L.; GOLD, M.S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. **Proc Natl Acad Sci**. 98:11845–11846, 2001.

SUCHER, R.; SCHROECKSNADEL, K.; WEISS, G.; MARGREITER, R.; FUCHS, D.; BRANDACHER, G. Neopterin, a prognostic marker in human malignancies. **Cancer Lett**, 287(1):13-22, 2010.

SUH, H.W.; SONG, D.K.; WIE, M.B.; JUNG, J.S.; HONG, H.E.; CHOI, S.R.; KIM, Y.H. The reduction of antinociceptive effect of morphine administered intraventricularly is correlated with the decrease of serotonin release from the spinal cord in streptozotocin-induced diabetic rats. **Gen Pharmacol**, 27(3):445-50, 1996.

SUN, J.S.; YANG, Y.J.; ZHANG, Y.Z.; HUANG, W.; LI, Z.S.; ZHANG, Y. Minocycline attenuates pain by inhibiting spinal microglia activation in diabetic rats. **Mol Med Rep**, 12(2):2677-82, 2015.

TEMBHURNE, S.V.; SAKARKAR, D.M. Effect of Fluoxetine on an Experimental Model of Diabetes-induced Neuropathic Pain Perception in the Rat. **Indian J Pharm Sci**, 73(6):621-5, 2011.

THACKRAY, S.J.; MOWAT, C.G.; CHAPMAN, S.K. Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. **Biochem. Soc. Trans**, 36, 1120–1123, 2008.

(b)TESFAYE, S.; WILHELM, S.; LLEDO, A.; SCHACHT, A.; TÖLLE, T.; BOUHASSIRA, D.; CRUCCU, G.; SKLJAREVSKI, V.; FREYNHAGEN, R. Duloxetine and pregabalin: high-dose monotherapy or their combination? The "COMBO-DN study"--a multinational, randomized, double-blind, parallel-group study in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. **PAIN**, 154(12):2616-25, 2013.

(a)TESFAYE, S.; BOULTON, A.J.; DICKENSON, A.H. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. *DIABETES CARE*, 36(9):2456-65, 2013. Review.

TOMIYAMA, M.; FURUSAWA, K.; KAMIJO, M.; KIMURA, T.; MATSUNAGA, M.; BABA, M. Upregulation of mRNAs coding for AMPA and NMDA receptor subunits and metabotropic glutamate receptors in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of diabetes mellitus. *Brain Res Mol Brain Res*, 136(1-2):275-81, 2005.

TVRDEIC, A.; ĐURKOVIC, M.; CICIN-SAIN, L.; JERNEJ, B.; BIRUS, I. Pain sensitivity in Wistar and Wistar-Zagreb 5HT rats: The effect of single dose of fluoxetine. *Period Biol* 106 (Suppl. 1), 86, 2004.

VÉCSEI, L.; SZALÁRDY, L.; FÜLÖP, F.; TOLDI, J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov*, 12(1):64-82, 2013.

VINIK, A.I.; HOLLAND, M.T.; LE BEAU, J.M.; LIUZZI, F.J.; STANSBERRY, K.B.; COLEN, L.B.; Diabetic neuropathies. *Diabetes Care*, 15(12):1926-75, 1992, Review.

VINIK, A.I.; MEHRABYAN, A. Diabetic neuropathies. *Med Clin North Am*, 88(4):947-99, xi, 2004.

WEINSTEIN, D.E.; SHELANSKI, M.L.; LIEM, R.K. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol*, 112(6):1205-13, 1991.

WIDNER, B.; LAICH, A.; SPERNER-UNTERWEGER, B.; LEDOCHOWSKI, M.; FUCHS, D. Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression--what is the link? *Brain Behav Immun*, 16(5):590-5, 2002.

WODARSKI, R.; CLARK, A.K.; GRIST, J.; MARCHAND, F.; MALCANGIO, M. Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pain*, 13(8):807-11, 2009.

WOLOWCZUK, I.; HENNART, B.; LELOIRE, A.; BESSEDE, A.; SOICHOT, M.; TARONT, S.; CAIAZZO, R.; RAVERDY, V.; PIGEYRE, M.; ABOS CONSORTIUM.; GUILLEMIN, G.J.; ALLORGE, D.; PATTOU, F.; FROGUEL, P.; POULAIN-GODEFROY, O. Tryptophan metabolism activation by indolamine 2,3-dioxygenase in

adipose tissue of obese women: an attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 303(2):R135-43, 2012.

WU, W.; NICOLAZZO, J.A.; WEN, L.; CHUNG, R.; STANKOVIC, R.; BAO, S.S.; LIM, C.K.; BREW, B.J.; CULLEN, K.M.; GUILLEMIN, G.J. Expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and production of kynurenine pathway metabolites in triple transgenic mice and human Alzheimer's disease brain. **PLoS One**, 22;8(4):e59749, 2013.

YAKSH, T.L, RUDY, T.A. Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. **Pain**, 4(4):299-359,1978, Review.

YAN, X.; WENG, H.R. Endogenous interleukin-1 β in neuropathic rats enhances glutamate release from the primary afferents in the spinal dorsal horn through coupling with presynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptors. **J Biol Chem**, 288(42):30544-57, 2013

YARNITSKY, D.; GRANOT, M.; NAHMAN-AVERBUCH, H.; KHAMAISI, M.; GRANOVSKY, Y. Conditioned pain modulation predicts duloxetine efficacy in painful diabetic neuropathy. **Pain**,153(6):1193-8, 2012.

YU, R.; GOLLUB, R.L.; SPAETH, R.; NAPADOW, V.; WASAN, A.; KONG, J. Disrupted functional connectivity of the periaqueductal gray in chronic low back pain. **Neuroimage Clin**. 2014 Aug 23;6:100-8.

YOUSEFZADEH, N.; ALIPOUR, M.R.; SOUFI, F.G.; Deregulation of NF- κ B-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **J Physiol Biochem**, 71(1):51-8, 2015.

YUASA, H.J.; BALL, H.J.; AUSTIN, C.J.; HUNT, N.H. 1-L-methyltryptophan is a more effective inhibitor of vertebrate IDO2 enzymes than 1-D-methyltryptophan. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**,157(1):10-5, 2010.

ZHONG, G.; FAN, T.; LIU, L. Chlamydia inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. **J Exp Med**,189(12):1931-8, 1999.

ZHOU, W, DANTZER, R.; BUDAC, D.P.; WALKER, A.K.; MAO-YING, Q.L.; LEE, A.W.; HEIJNEN, C.J.; KAVELAARS, A. Peripheral indolamine 2,3-dioxygenase 1 is

required for comorbid depression-like behavior but does not contribute to neuropathic pain in mice. **Brain Behav Immun.**, 46:147-53, 2015.

ZUNSZAIN, P.A.; ANACKER, C.; CATTANEO, A.; CHOUDHURY, S.; MUSAELYAN, K.; MYINT, A.M.; THURET, S.; PRICE, J.; PARIANTE, C.M. Interleukin-1 β : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, 37(4):939-49, 2012.

ZWILLING, D.; HUANG, S.Y.; SATHYASAIKUMAR, K.V.; NOTARANGELO, F.M.; GUIDETTI, P.; WU, H.Q.; LEE, J.; TRUONG, J.; ANDREWS-ZWILLING, Y.; HSIEH, E.W.; LOUIE, J.Y.; WU, T.; SCEARCE-LEVIE, K.; PATRICK, C.; ADAME, A.; GIORGINI, F.; MOUSSAOUI, S.; LAUE, G.; RASSOULPOUR, A.; FLIK, G.; HUANG, Y.; MUCHOWSKI, J.M.; MASLIAH, E.; SCHWARCZ, R.; MUCHOWSKI, P.J. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. **Cell**;145(6):863-74, 2011.