

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARINA FERNANDA MATTEDI NONES

ALTERAÇÕES SENSORIAIS OROFACIAIS EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO
POR ESTREPTOZOTOCINA

CURITIBA
2012

CARINA FERNANDA MATTEDI NONES



ALTERAÇÕES SENSORIAIS OROFACIAIS EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO
POR ESTREPTOZOTOCINA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no curso de Pós Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Geremias Chichorro

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Joice Maria da Cunha

CURITIBA
2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Nones, Carina Fernanda Mattedi

Alterações sensoriais orofaciais em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. / Carina Fernanda Mattedi Nones. – Curitiba, 2012. 73f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Juliana Geremias Chichorro

Co-orientadora: Joice Maria da Cunha

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Diabetes. 2. Hiperalgisia. 3. Morfina. 4. Neuropatia. I. Título II. Chichorro, Juliana Geremias. III. Cunha, Joice Maria da. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “ALTERAÇÕES SENSORIAIS OROFACIAIS EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA.”, de autoria da pós-graduanda **CARINA FERNANDA MATTEDI NONES**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro e co-orientação da Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha, e composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Farmacologia - UFPR) e Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos (Farmacologia – USP) reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi Aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 31 de agosto de 2012.

Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Farmacologia - UFPR)

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos (Farmacologia – USP)

Aos amados Rodrigo e Artur.
Aos meus irmãos, Carla e Leandro.
Aos meus pais, Hortêncio e Ondina.
Por todo amor, por quem sou e por tudo o que alcancei.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Prof.^a Juliana Geremias Chichorro pela oportunidade, valiosa orientação, incentivo e confiança durante o curso;

À Prof.^a Joice Maria da Cunha pela co-orientação e por participar com disposição de todas as discussões deste trabalho;

À Prof.^a Janaína Menezes Zanoveli pela ajuda e carinho;

À Prof.^a Djanira Aparecida da Luz Veronez pelo auxílio com as análises de estereologia;

Aos membros da banca examinadora Prof. Aleksander Roberto Zampronio e Prof. Carlos Ferreira dos Santos por participarem e contribuírem para a melhoria deste trabalho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia e ao biotério da UFPR;

À amiga Renata Cristiane dos Reis pelo estímulo e colaboração desde a decisão de iniciar o mestrado;

Às amigas Caroline Machado Kopruszinski e Fernanda Cassanho Teodoro pela amizade e companheirismo;

Ao Carlos Henrique Alves Jesus pela participação nos experimentos, sobretudo na fase final do trabalho;

A toda a equipe do laboratório de Farmacologia da dor da UFPR pelos bons momentos de descontração e colaboração que passamos juntos;

Aos meus queridos pais pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos;

Ao Rodrigo pela intensa participação em minha vida;

Aos pequenos Artur, Amanda e Larissa por diariamente me fazerem sorrir;

Aos animais que deram a vida sem direito de escolha;

A todos que participaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho;

À CAPES pelo suporte financeiro.

"Se só fazemos o que sempre fizemos, teremos sempre e só o que sempre tivemos."
Granny Donaldson

RESUMO

A neuropatia periférica é uma das complicações mais comuns do diabetes e é frequentemente acompanhada por episódios de dor, os quais podem afetar aproximadamente 50% dos pacientes. Existem evidências de que a neuropatia diabética também acomete o nervo trigêmeo, alterando a transmissão da informação sensorial orofacial. Este estudo avaliou o desenvolvimento de alterações sensoriais na face de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, bem como sua sensibilidade aos tratamentos com pregabalina e morfina. Animais diabéticos apresentaram respostas similares à aplicação de formalina no lábio superior direito quando comparados ao grupo controle nas semanas 1, 2 e 4 após tratamento com estreptozotocina (ANOVA seguida de *post hoc* de Duncan). Além disso, não foram observadas diferenças no limiar mecânico orofacial entre animais normoglicêmicos e diabéticos, entre as semanas 1 e 5 após o tratamento com estreptozotocina (Teste *t Student*). No entanto, os mesmos animais quando avaliados na pata, apresentaram um limiar mecânico significativamente reduzido entre as semanas 1 e 5 após a estreptozotocina (Teste *t Student*). Por outro lado, animais diabéticos desenvolveram hiperalgesia orofacial térmica, a qual foi diferente do grupo controle entre as semanas 1 e 5 (para o estímulo térmico calor) e 2 e 5 (para o estímulo térmico frio) após a estreptozotocina (Teste *t Student*). A análise estereológica do gânglio do trigêmeo de animais normoglicêmicos revelou que aproximadamente 43% do volume ganglionar correspondia a corpos celulares de neurônios. Já em animais diabéticos, a estereologia dos gânglios do trigêmeo coletados 5 semanas após a estreptozotocina, indicou perda neuronal, pois o volume do gânglio ocupado pelos corpos celulares passou a ser de 22% (Teste *t Student*). O tratamento de animais diabéticos com pregabalina (na dose de 30 mg/Kg, mas não na dose de 10 mg/Kg), na quarta ou quinta semana após estreptozotocina, reduziu a hiperalgesia orofacial ao calor e ao frio, com efeito anti-hiperalgésico observado até a sexta hora. O tratamento com morfina (2,5 mg/Kg) 4 ou 5 semanas após a estreptozotocina reduziu a hiperalgesia orofacial ao calor e ao frio, porém seu efeito foi significativo somente 30 min (para ambos os estímulos) e 1 h (para o estímulo térmico calor) após a administração (ANOVA seguida de *post hoc* de Duncan). Ambos os tratamentos não ocasionaram déficit motor nos animais avaliados no teste do campo aberto (ANOVA seguida de *post hoc* de Duncan). Os resultados do presente estudo demonstraram que animais tratados com estreptozotocina apresentam perda neuronal no gânglio trigeminal, não respondem diferente do grupo controle aos estímulos químico e mecânico e desenvolvem hiperalgesia orofacial térmica ao frio e ao calor, a qual é mais suscetível a redução pela pregabalina em comparação à morfina.

Palavras-chave: Diabetes. Hiperalgesia. Pregabalina. Morfina.

ABSTRACT

Peripheral neuropathy is one of the most common complications of diabetes and is often accompanied by episodes of pain, which can affect approximately 50% of patients. There is evidence that diabetic neuropathy may also involve the trigeminal nerve, altering the transmission of orofacial sensory information. Herein, this study evaluated the development of orofacial sensory changes after streptozotocin-induced diabetes in rats, as well as their sensitivity to pregabalin and morphine treatments. Diabetic rats showed similar responses to 1% formalin application into the upper lip compared to normoglycemic rats on weeks 1, 2 and 4 after streptozotocin (ANOVA followed by Duncan's post-hoc test). Additionally, there was no change in the facial mechanical threshold of normoglycemic and diabetic rats, on weeks 1 up to 5 after streptozotocin, while the paw mechanical threshold of diabetic rats was significantly reduced (Student t test). In contrast, diabetic rats developed orofacial heat and cold hyperalgesia, which was different from normoglycemic rats on weeks 1 up to 5 (for the heat stimulus) and 2 up to 5 (for the cold stimulus) after streptozotocin (Student t test). Stereological analysis of the trigeminal ganglia of normoglycemic animals revealed that over 43% of the ganglion volume corresponded to neuronal cell bodies. However, in diabetic animals, stereology of trigeminal ganglia collected 5 weeks post-streptozotocin, indicated neuronal loss, since the ganglion volume occupied by neuronal cell bodies was 22% of the total volume (Student t test). Pregabalin treatment (at 30 mg/kg, but not at 10 mg/kg, p.o.) of diabetic rats, on weeks 4 or 5 after streptozotocin, resulted in marked and prolonged (up to 6 h) reduction of heat and cold orofacial hyperalgesia. Likewise, morphine treatment (2.5 mg/kg, s.c.) abolished orofacial heat and cold hyperalgesia assessed 4 or 5 weeks after streptozotocin, but its effect was significantly only at 30 min (for both stimulus) and 1 h (for the heat stimulus) after the administration (ANOVA followed by Duncan's post-hoc test). Both treatments did not cause motor deficit in animals evaluated in the open field test (ANOVA followed by Duncan's post-hoc test). In conclusion, the results of the present study demonstrated that STZ-treated rats exhibited significant trigeminal neuronal loss, did not show orofacial mechanical or chemical hyperalgesia and developed long-lasting orofacial heat and cold hyperalgesia, which is more amenable to reduction by pregabalin than morphine.

Keywords: Diabetes. Hyperalgesia. Pregabalin. Morphine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	–	COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL INDUZIDO POR FORMALINA A 1% EM ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS E DIABÉTICOS.....	41
FIGURA 2	–	COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL INDUZIDO POR FORMALINA A 0,5% EM ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS E DIABÉTICOS.....	42
FIGURA 3	–	AVALIAÇÃO DO LIMIAR MECÂNICO NA FACE E NA PATA APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES.....	44
FIGURA 4	–	DECURSO TEMPORAL DA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES.....	46
FIGURA 5	–	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DO GÂNGLIO DO TRIGÊMEO EM ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS E DIABÉTICOS.....	47
FIGURA 6	–	EFEITO DA PREGABALINA E DA MORFINA NA HIPERALGESIA AO CALOR EM ANIMAIS DIABÉTICOS.....	49
FIGURA 7	–	EFEITO DA PREGABALINA E DA MORFINA NA HIPERALGESIA AO FRIO EM ANIMAIS DIABÉTICOS.....	50
FIGURA 8	–	EFEITO DA PREGABALINA E DA MORFINA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA AVALIADA NO TESTE DO CAMPO ABERTO...	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – 5 hidroxitriptamina

ADA – Associação Americana de Diabetes

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CMC – carboximetilcelulose

DM – diabetes mellitus

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPN – Neuropatia diabética periférica

GABA – ácido gama-aminobutírico

HbA1c – hemoglobina glicada

IASP – Associação Internacional para Estudo da Dor

IDF – Federação Internacional do Diabetes

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-6 – interleucina 6

NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NMDA – N-metil-D-aspartato

PGB – pregabalina

STZ – estreptozotocina

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TRPA1 – receptor de potencial transitório com domínios anquirina 1

TRPV1 – receptor de potencial transitório vanilóide-1

VGCC – Canal de cálcio dependente de voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 O DIABETES	11
1.2 CLASSIFICAÇÃO E FISIOPATOLOGIA	12
1.3 DIAGNÓSTICO	14
1.4 SINTOMAS E COMPLICAÇÕES	15
1.5 NEUROPATIA DIABÉTICA PERIFÉRICA	17
1.6 DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA	18
1.7 CONTROLE FARMACOLÓGICO DA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA	19
1.8 ESTREPTOZOTOCINA COMO MODELO ANIMAL DE DIABETES	22
1.9 HIPERALGESIA EM DIABETES EXPERIMENTAL	24
1.10 SISTEMA SENSORIAL TRIGEMINAL	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 MATERIAL	31
3.1.1 Animais	31
3.1.2 Reagentes, drogas e soluções	31
3.2 MÉTODOS	32
3.2.1 Indução do diabetes	32
3.2.2 Avaliação do peso corporal	32
3.2.3 Teste da formalina	32
3.2.4 Estimulação mecânica	33
3.2.5 Estimulação térmica ao calor	34
3.2.6 Estimulação térmica ao frio	35
3.2.7 Análise estereológica do gânglio trigeminal	35
3.2.8 Campo aberto (<i>Open Field</i>)	36
3.2.9 Protocolos experimentais	37
3.2.10 Análise Estatística	37
4 RESULTADOS	39
4.1 ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE GLICOSE E NO PESO CORPORAL	39
4.2 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA	40
4.3 LIMIAR MECÂNICO OROFACIAL E NA PATA DE RATOS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES	43
4.4 HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES	45
4.5 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DO GÂNGLIO DO TRIGÊMEO DE ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS E DIABÉTICOS	47
4.6 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM PREGABALINA E MORFINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL EM ANIMAIS DIABÉTICOS	48
4.7 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS NO CAMPO ABERTO APÓS O TRATAMENTO COM PREGABALINA E MORFINA	51
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 O DIABETES

Segundo a Organização Mundial da Saúde o diabetes é definido como sendo uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente, ou quando o organismo não é capaz de utilizá-la de forma eficiente, gerando um aumento na concentração de glicose sanguínea (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Esta patologia tem origem multifatorial e se desenvolve a partir da interação entre fatores ambientais e predisposição genética (SALGADO, 2007).

A Federação Internacional do Diabetes (*International Diabetes Federation – IDF*) estima que atualmente o número de adultos com diabetes no mundo seja 366 milhões, representando 8,3% da população. Este número deverá aumentar para 552 milhões de pessoas até o ano de 2030. A IDF ainda estima que aproximadamente 183 milhões de pessoas não sabem que têm a doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012). Estes dados são importantes para incentivar medidas que previnam o anunciado agravamento da situação. Shaw e colaboradores estimaram a prevalência padronizada por sexo e idade do diabetes, tendo como referência a população mundial de 2010, e obtiveram projeções para 2030 em diversos países do mundo, dentre eles, o Brasil. De acordo com essas estimativas, entre 2010 e 2030, haverá um aumento de 69% no número de adultos, com idade entre 20 e 79 anos, com diabetes nos países em desenvolvimento e um aumento de 20% nos países desenvolvidos (SHAW *et al.*, 2010). A relevância do diabetes pode ser dimensionada por sua prevalência média em nove capitais brasileiras, estimada em 7,6% em adultos de 30 a 69 anos de idade, segundo estudo multicêntrico realizado no fim da década de 80. A investigação evidenciou a tendência do aumento da prevalência para as regiões Sudeste e Sul, o desconhecimento da própria condição por cerca da metade dos indivíduos portadores da doença e a não realização de qualquer tratamento entre 1/5 dos que a conhecem (GUTIERRES, 2011; ROSA, 2006).

O aumento da prevalência desta doença tem sido relacionado principalmente com mudanças no estilo de vida das pessoas, que levam à redução da atividade física e ao aumento da obesidade e com o aumento da expectativa de vida da

população (SCHMIDT *et al.*, 2009).

O impacto da obesidade sobre o risco de desenvolver diabetes (sobretudo o tipo 2) é alarmante e segundo estudos recentes, o diabetes seria um problema mais facilmente administrável se a obesidade pudesse ser controlada (ASHCROFT & RORSMAN, 2012).

Esta patologia ainda apresenta alto impacto econômico uma vez que as hospitalizações atribuíveis ao diabetes representam 9% dos gastos hospitalares do Sistema Único de Saúde (SCHMIDT *et al.*, 2009). Além disso, dados atuais mostram que os custos com a doença e suas complicações atingem 612 milhões de dólares por ano nos Estados Unidos (ASHCROFT & RORSMAN, 2012). Apesar de políticas e reformas setoriais dos sistemas de saúde, o diabetes continua a representar um desafio para governos e sociedades devido à carga de sofrimento, incapacidade, perda de produtividade e morte prematura que provoca (ROSA, 2006).

Os sinais e sintomas evoluem lentamente, dificultando a descoberta e o estabelecimento de diagnóstico precoce. Assim, muitas pessoas comumente recebem o diagnóstico após a manifestação de complicações da doença, tais como as cardiovasculares (TAVARES *et al.*, 2011).

1.2 CLASSIFICAÇÃO E FISIOPATOLOGIA

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association* – ADA) inclui quatro classes clínicas: Diabetes Mellitus (DM) tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Existem ainda duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares.

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento, portanto sugere-se que os termos DM insulino-dependente e DM insulino-independente não sejam mais empregados (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

O DM tipo 1 resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas associada à tendência à cetoacidose, que é um processo de

descompensação metabólica. O DM tipo 1 inclui casos decorrentes de doença autoimune e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM 1. Corresponde a 5% a 10% do total de casos. A taxa de destruição das células beta é variável, sendo em geral mais rápida entre as crianças e adolescentes. A forma lentamente progressiva ocorre geralmente em adultos e é referida como diabetes latente autoimune do adulto.

O DM tipo 2 resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como durante infecções graves. O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito a partir dos 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo. Abrange 90% a 95% do total de casos. Nos últimos anos a incidência do DM tipo 2 vem aumentando entre crianças e jovens, o que está sendo relacionado ao aumento da obesidade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Os pacientes não dependem de insulina exógena para sobrevivência, porém podem necessitar de tratamento com insulina para a obtenção de um controle metabólico adequado (BORTOLETTO, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

Existem ainda outras formas menos comuns de DM, as quais podem ser decorrentes de defeitos genéticos associados a outras doenças, ao uso de fármacos diabetogênicos, dentre outras causas. A apresentação clínica desse grupo é bastante variada e depende da patologia associada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

O diabetes gestacional é caracterizado por uma diminuição da tolerância à glicose, de magnitude variável, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto. Nesses casos, aventa-se ainda a possibilidade da condição existir antes da gravidez, mas não ter sido diagnosticada. Similar ao DM 2, o DM gestacional é associado tanto a resistência à insulina quanto à diminuição da função das células beta. O DM gestacional ocorre em 1-14% de todas as gestações, dependendo da população estudada, e é associado a aumento de morbidade e mortalidade perinatal. Pacientes com DM gestacional devem ser reavaliadas quatro a seis semanas após o parto e reclassificadas como apresentando DM, glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose diminuída ou normoglicemia. Na maioria dos casos há reversão para a tolerância à glicose normal

após a gravidez, porém existe um risco de 10-63% de desenvolvimento de DM 2 no período de 5 a 16 anos após o parto (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

O estado de pré-diabetes refere-se a um estado intermediário entre a homeostase normal da glicose e o DM. A categoria “glicemia de jejum alterada” refere-se aos pacientes que apresentam glicemia de jejum inferior ao critério diagnóstico para o DM, porém mais elevada do que o valor normal de referência. A categoria “tolerância à glicose diminuída” inclui pacientes que apresentam esta condição no estado pós-sobrecarga, a qual é diagnosticada através do teste oral de tolerância à glicose, que inclui a determinação da glicemia de jejum e de 2 horas após a sobrecarga oral com 75 g de glicose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

1.3 DIAGNÓSTICO

A evolução para o DM 2 ocorre ao longo de um período de tempo variável enquanto no DM 1 o início geralmente é abrupto, com sintomas indicando de maneira sólida a presença da enfermidade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Os critérios para diagnóstico do DM foram modificados em 1997 pela ADA, e posteriormente aceitos pela Organização Mundial da Saúde e pela Sociedade Brasileira de Diabetes. As modificações foram realizadas com a finalidade de prevenir de maneira eficaz as complicações micro e macrovasculares desta patologia. Atualmente são três os critérios aceitos para o diagnóstico de DM:

1. Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual acima de 200 mg/dL. Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições;

2. Glicemia de jejum \geq 126 mg/dL. Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia;

3. Glicemia 2 h após sobrecarga oral de 75 g de glicose acima de 200 mg/dL. O teste de tolerância à glicose deve ser efetuado com os cuidados preconizados pela OMS, com colheita para diferenciação de glicemia em jejum e 120 min após a ingestão de glicose (INZUCCHI, 2012; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; VIEGAS-PEREIRA, 2006).

Os critérios para o diagnóstico das categorias glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída são apresentados a seguir:

1. Glicemia de jejum acima de 100 mg/dL e abaixo de 126 mg/dL. Esse critério ainda não foi oficializado pela OMS, porém já existe uma recomendação da IDF acatando o ponto de corte para 100 mg/dL.

2. Tolerância à glicose diminuída quando, após uma sobrecarga de 75 g de glicose, o valor de glicemia de 2 h se situa entre 140 e 199 mg/dL (INZUCCHI, 2012; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

É importante salientar ainda a existência do exame da hemoglobina glicada (HbA1c) como parâmetro de referência para avaliar o grau de hiperglicemia crônica entre os pacientes diabéticos. Esta técnica se tornou medida de referência para o controle do diabetes (BARBOSA *et al.*, 2008; CAVAGNOLLI, 2009).

A hemoglobina é uma proteína encontrada nas células vermelhas do sangue. Na corrente sanguínea, a glicose adere à hemoglobina formando a chamada hemoglobina glicada (HbA1c). O aumento dos níveis de glicose no sangue contribui para aumentar a ligação e os níveis de HbA1c. Esta ligação permanece durante os 90 a 120 dias de vida do glóbulo vermelho. A HbA1c é interpretada como sendo uma média da glicose no sangue presente ao longo dos últimos 3-4 meses. Sua medição é aceita como sendo um índice de glicemia média no tratamento de pacientes com diabetes. As decisões a respeito do tratamento baseiam-se frequentemente nos níveis de HbA1c (PEREIRINHA, 2011). Valores para HbA1c entre 4% e 6% são considerados normais. Níveis acima de 7% estão associados a um risco progressivamente maior de complicações crônicas. Dessa maneira, o conceito atual de tratamento do diabetes define a meta de 7% como limite superior, acima do qual está indicada a revisão do esquema terapêutico em vigor (CAVAGNOLLI, 2009). A Sociedade Brasileira de Diabetes recomenda valores de HbA1c inferiores a 6,5% (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

1.4 SINTOMAS E COMPLICAÇÕES

Os sintomas do diabetes (tipo 1 e 2) incluem sede e apetite incontroláveis, cansaço extremo, visão embaçada, aumento na frequência urinária, irritabilidade, pele seca, perda repentina de peso e dificuldade de cicatrização. Os sintomas

iniciais para o DM 1 podem ser náuseas, vômitos e dores abdominais. Porém, algumas pessoas não apresentam tais sintomas (VIEGAS-PEREIRA, 2006). No caso do DM 2, pode haver um período assintomático de até dez anos, o que retarda seu diagnóstico e favorece o desenvolvimento de complicações crônicas, que conduzem ao diagnóstico somente por suas manifestações clínicas, às vezes irreversíveis (BORTOLETTO, 2010; VIEGAS-PEREIRA, 2006).

Independentemente do tipo do diabetes, uma das maiores preocupações dos profissionais de saúde é a prevenção das complicações, devido à sua gravidade e repercussões para o paciente, família e sociedade (BORTOLETTO, 2010).

As complicações do diabetes podem ser microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) ou macrovasculares (doença cardiovascular, acidentes cerebrais vasculares e doença vascular periférica) (MELENDEZ-RAMIREZ *et al.*, 2010). A incidência e prevalência das complicações microvasculares aumentam de acordo com a duração do diabetes (STOLAR, 2010). Além disso, apesar da prevalência do DM tipo 1 ser inferior ao tipo 2, o DM 1 está associado a um risco elevado de complicações, responsáveis por elevado consumo de recursos da área da saúde, especialmente entre indivíduos mais jovens (FRANCIOSI *et al.*, 2012).

Em longo prazo, as complicações do diabetes, especialmente aquelas que afetam os olhos, os rins e o sistema cardiovascular, são as principais causas de morbidade e mortalidade entre pacientes. Devido à alta prevalência do diabetes, estas complicações são importantes problemas de saúde pública, sendo responsáveis por uma grande proporção dos casos de cegueira, terapia renal substitutiva e intervenções cardiovasculares (DORIA, 2010). Existem evidências claras de que o controle glicêmico em ambos os tipos de diabetes reduz a probabilidade de desenvolver tais complicações (DORIA, 2010; KILPATRICK, 2009). No entanto, na prática clínica, esta é uma tarefa um tanto difícil, sendo que aproximadamente 50% dos pacientes não atingem o valor recomendado para a HbA1c. Portanto, há uma clara necessidade de intervenções adicionais na tentativa de diminuir o impacto da hiperglicemia entre os pacientes que não conseguem controlá-la (DORIA, 2010).

1.5 NEUROPATIA DIABÉTICA PERIFÉRICA

A neuropatia diabética periférica (*Diabetic Peripheral Neuropathy – DPN*) é uma das complicações mais comuns do diabetes, atingindo cerca de 50% dos pacientes (TESFAYE & SELVARAJAH, 2012; YAGIHASHI *et al.*, 2007). A DPN pode ser definida como sendo uma alteração funcional e estrutural no sistema nervoso periférico (YAGIHASHI *et al.*, 2007), comumente associada à dor neuropática, sintomas de impotência e gastroparesia (SUGIMOTO *et al.*, 2000).

A principal forma de neuropatia (80% dos casos) atinge os membros distais e é simétrica. Nesta forma de neuropatia, os sinais e sintomas se iniciam em membros como mãos e pés e tendem a piorar, afetando membros mais proximais, demonstrando que as fibras mais longas são inicialmente comprometidas (SAID, 2007). Os nervos sensoriais periféricos são afetados nessa condição, na qual se observa uma perda progressiva nas fibras, inicialmente aquelas de pequeno diâmetro, e com a progressão da doença as fibras de maior diâmetro são perdidas, o que está relacionado à redução na velocidade de condução nervosa (YAGIHASHI *et al.*, 2007).

No início da doença, os pacientes geralmente apresentam os sinais ou sintomas positivos, que são aqueles sobre os quais os pacientes se queixam, como a dor (espontânea ou evocada), as parestesias e as hiperpatias (FUCHS *et al.*, 2010; YAGIHASHI *et al.*, 2007). As parestesias são sensações subjetivas que ocorrem na ausência de estímulo, como formigamento ou dormência. As hiperpatias ocorrem quando a sensação dolorosa persiste após o estímulo ser cessado. Nesta fase, sugere-se que as fibras estão tentando se recuperar do dano. À medida que as fibras são perdidas, os pacientes deixam de ter sensibilidade no local e passam a apresentar os sinais ou sintomas negativos, que são aqueles sobre os quais os pacientes não se queixam, e incluem a perda de sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos. É nesta fase que aumentam os riscos de amputação (YAGIHASHI *et al.*, 2007).

Estudos em pacientes com DM tipo 1 e 2 têm mostrado que o mau controle glicêmico é um fator de risco para o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica, porém outros fatores de risco podem estar envolvidos (HINDER *et al.*, 2012; TEFAYE & SELVARAJAH, 2012). Estudos recentes sugerem uma relação entre dislipidemia, um fator de risco comum para doenças micro e macrovasculares,

e neuropatia diabética. Hiperglicemia e dislipidemia produzem alterações no metabolismo que podem levar à lesão celular e neuropatia (HINDER *et al.*, 2012). Um estudo realizado na Europa em pacientes com DM 1 revelou que tanto o controle glicêmico quanto a duração da doença estão envolvidos no desenvolvimento da neuropatia. Entretanto, mesmo pacientes com bom controle glicêmico (HbA1c < 5,4%) desenvolveram doença microvascular, sugerindo que outros fatores estejam envolvidos neste processo (TESFAYE & SELVARAJAH, 2012).

O diagnóstico de DPN depende de uma série de fatores, incluindo a presença de um padrão característico de sinais e sintomas. No exame clínico, muitos pacientes apresentam sinais de neuropatia, tais como uma redução na velocidade de condução nervosa, porém não apresentam sintomas. Se a avaliação clínica não for realizada de forma criteriosa e o paciente for assintomático, o diagnóstico será feito somente quando surgirem os primeiros sintomas, como parestesias, disestesias (redução na sensibilidade dos sentidos, sobretudo o tato) e dor neuropática (BARRETT *et al.*, 2007).

Muitos sinais e sintomas do diabetes podem ser atribuídos às alterações funcionais e estruturais detectadas em nervos periféricos, de modo que muitos estudos em modelos experimentais de diabetes têm explorado os mecanismos envolvidos na DPN (YAGIHASHI *et al.*, 2007). Dentre as alterações observadas na DPN está a dor neuropática.

1.6 DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

Dor neuropática é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain – IASP*) como “dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso”. A dor relacionada à DPN é chamada de dor neuropática diabética. Enquanto inúmeros estudos têm sido conduzidos para avaliação da neuropatia diabética, poucos têm especificamente avaliado pacientes com dor neuropática diabética (BARRETT *et al.*, 2007).

Cerca de 30% dos pacientes com DPN desenvolvem a dor neuropática diabética (TESFAYE & SELVARAJAH, 2012), que pode ser muito debilitante e difícil de tratar. Tem sido relatado que os estados doloroso e indolor da neuropatia

diabética podem representar duas síndromes distintas. Entretanto, análises microscópicas que avaliaram degradação e regeneração de fibras mostraram que ocorrem alterações similares nestes dois estados (CHEN & LEVINE, 2001).

Pacientes com dor neuropática diabética podem apresentar uma grande diversidade de sintomas, que incluem sensação de choque, lancetadas/agulhadas ou ardência, muitas vezes com piora à noite, e ainda dormência ou perda de sensibilidade da área envolvida. No exame físico, os pacientes podem apresentar perda da sensação de vibração, temperatura, picada, pressão e redução ou ausência do reflexo de Aquiles (COLE, 2007).

A dor pode se apresentar de forma espontânea ou evocada (SELVARAJAH *et al.*, 2011). A dor evocada pode se manifestar como alodinia ou hiperalgesia. A hiperalgesia é definida como sendo um aumento da sensibilidade a estímulos normalmente dolorosos (SUN *et al.*, 2012), enquanto que a alodinia é caracterizada por dor a um estímulo inócuo (SELVARAJAH *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2012). Pacientes diabéticos frequentemente apresentam dor espontânea e alodinia (SELVARAJAH *et al.*, 2011).

Existem ainda evidências clínicas de que pacientes com DPN apresentam uma maior incidência de dor orofacial. Nesse sentido, Arap e colaboradores relataram que 55,2% dos pacientes com DM 2 e DPN apresentavam alguma forma de dor orofacial. Este estudo ainda relata uma correlação positiva entre os níveis de glicemia e HbA1c com o limiar de dor orofacial (ARAP *et al.*, 2010). Outro estudo avaliou a hipótese de que pessoas com diabetes e dor orofacial vivenciam mais intensamente os impactos funcionais e emocionais da doença do que pacientes com dor orofacial não diabéticos. Segundo os autores, pacientes diabéticos são mais propensos a sentir dor todos os dias, sofrer emoções negativas associadas, interromper atividades diárias e sono e consultar serviços de emergência por causa da dor orofacial (RAHIM-WILLIAMS *et al.*, 2010).

1.7 CONTROLE FARMACOLÓGICO DA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

O controle glicêmico é importante para retardar o desenvolvimento da neuropatia diabética e, conseqüentemente da dor neuropática diabética (BARRETT *et al.*, 2007; COLE, 2007). A maioria das terapias, farmacológicas e não

farmacológicas, resulta em 30 a 50% de redução da dor, o que é considerado insatisfatório por muitos pacientes (BARRETT *et al.*, 2007). O controle farmacológico da dor rotineiramente envolve o tratamento com associações de fármacos, causando uma série de efeitos adversos e interações (COLE, 2007).

Existe uma recomendação internacional, baseada em evidências apresentadas em ensaios clínicos de eficácia e segurança com vários agentes farmacológicos para o tratamento da dor neuropática diabética, que indica a utilização de antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina ou ligantes $\alpha_2\delta$ dos canais de cálcio dependentes de voltagem (*Voltage Gated Calcium Channels* – VGCCs), como primeira linha de tratamento. Neste contexto, a duloxetina e a pregabalina (PGB) são indicadas como drogas de escolha dentre os inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina e ligantes $\alpha_2\delta$, respectivamente. Estes tratamentos podem ser combinados com drogas opióides, quando o controle da dor ainda for considerado insatisfatório (TESFAYE & SELVARAJAH, 2012).

A seleção do tratamento deve ser influenciada pela análise das contra indicações de cada uma das classes e leva em conta dados de comorbidades e custos. Por exemplo, em pacientes diabéticos com histórico de doença cardíaca, bem como em pacientes idosos que fazem uso de diuréticos ou anti-hipertensivos, o uso de antidepressivos tricíclicos é contraindicado. Adicionalmente, em pacientes com doença hepática a prescrição de duloxetina não é recomendada, enquanto que em pacientes com edema periférico o tratamento com PGB deve ser evitado (TESFAYE & SELVARAJAH, 2012).

Os antidepressivos tricíclicos apresentam efeito analgésico para estímulos mecânicos, térmicos e elétricos em pacientes diabéticos (TESFAYE *et al.*, 2011). O efeito analgésico é atribuído, inicialmente, à inibição do transporte neuronal (recaptação) de noradrenalina e a um variável bloqueio no transporte de serotonina nas vias supressoras da dor (DICK *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008; TEFAYE *et al.*, 2011). Entretanto, vários mecanismos adicionais têm sido propostos para explicar seu efeito analgésico, tais como o antagonismo de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) para glutamato (DICK *et al.*, 2007; TEFAYE *et al.*, 2011), bloqueio de receptores de histamina, efeitos diretos e indiretos sobre receptores opióides e interações com receptores periféricos de adenosina. Em adição, tem sido descrito

que os antidepressivos tricíclicos podem atuar bloqueando canais de sódio dependentes de voltagem, um mecanismo comum a várias drogas com potencial analgésico em dores neuropáticas (DICK *et al.*, 2007). Como esta classe de drogas apresenta inúmeros e frequentes efeitos colaterais, como sonolência e efeitos anticolinérgicos (boca seca, visão embaçada, constipação, retenção urinária, hipotensão postural, sedação, entre outros), recomenda-se iniciar o tratamento com uma dose mais baixa (especialmente para pacientes idosos) de aproximadamente 10 mg/dia, a qual pode ser aumentada até 75 mg/dia (TESFAYE *et al.*, 2011).

Os inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina, como a duloxetina, produzem analgesia principalmente pelo aumento da disponibilidade de 5-hidroxitriptamina e noradrenalina na via inibitória descendente da dor. As doses recomendadas variam de 60 a 120 mg/dia, e ensaios clínicos mostram que esse tratamento pode promover o alívio da dor em torno de 50% e em aproximadamente 50% dos pacientes avaliados. O uso da duloxetina não está associado a ganho de peso e os efeitos adversos mais frequentemente relatados incluem náusea, sonolência, tontura, constipação, boca seca e redução do apetite (TESFAYE *et al.*, 2011).

A PGB apresenta um mecanismo de ação diferente de outros agentes anticonvulsivantes, os quais atuam principalmente na inibição de canais de sódio. Ela tem a capacidade de ligação à subunidade $\alpha 2\delta$ de VGCCs em neurônios pré-sinápticos (KAVOUSSI, 2006; TEFAYE *et al.*, 2011). Em certos estados patológicos, como por exemplo, na dor neuropática, tem sido demonstrada uma hiperexcitabilidade neuronal, a qual está associada inclusive a um excessivo influxo de íons cálcio e subsequente liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios, como glutamato e substância P. A ligação da PGB na subunidade $\alpha 2\delta$ destes canais reduz o influxo de cálcio por alterações na conformação do canal. Isto resulta na redução da liberação de neurotransmissores excitatórios e redução na estimulação de receptores pós-sinápticos, reestabelecendo o estado fisiológico normal. Este mecanismo confere à PGB as propriedades ansiolítica, anticonvulsivante e analgésica (KAVOUSSI, 2006). Em ensaios clínicos, a PGB tem se mostrado altamente efetiva para o tratamento da dor neuropática diabética nas doses de 150-600 mg/dia. Os efeitos colaterais mais frequentes são tontura, sonolência, edema, dor de cabeça e ganho de peso (TESFAYE *et al.*, 2011).

O uso de opióides no controle das dores crônicas tem sido limitado principalmente em função de seus efeitos colaterais (HURLEY *et al.*, 2008) e potencial para adição (HURLEY *et al.*, 2008; TESFAYE *et al.*, 2011). Dentre os efeitos adversos mais comuns estão depressão respiratória, náusea, sedação, tolerância, disfunção cognitiva, entre outros (RIBEIRO *et al.*, 2002). Adicionalmente, a dor neuropática diabética tem sido relacionada com redução da eficácia analgésica de opióides (GULLAPALLI *et al.*, 2002; OTTO *et al.*, 2011; YAMAMOTO *et al.*, 2009), como será discutido adiante com mais detalhes.

Considerando os efeitos adversos relacionados ao uso contínuo de fármacos no tratamento da dor neuropática diabética, bem como seu controle ainda insatisfatório, é importante o uso de modelos animais de diabetes para o estudo desta patologia e suas complicações.

1.8 ESTREPTOZOTOCINA COMO MODELO ANIMAL DE DIABETES

A indução do diabetes experimental por estreptozotocina (STZ) é um dos modelos animais mais utilizados. Esta droga foi inicialmente isolada e caracterizada como um antimicrobiano de largo espectro a partir de colônias de *Streptomyces achromogenes* (ALI *et al.*, 2012; DELFINO *et al.*, 2002; REUSSER, 1971). Ela vem sendo reportada como indutora de diabetes experimental pela capacidade de destruição das células beta pancreáticas (ALI *et al.*, 2012). Junod e colaboradores confirmaram a especificidade da lesão das células beta através de análise histológica e reportaram que 24 horas após o tratamento com STZ o conteúdo de insulina das células beta é reduzido em 95% ou mais (JUNOD *et al.*, 1969).

Esta toxicidade dirigida para as células beta é devida à similaridade da molécula de STZ com a de glicose, o que permite que a mesma seja internalizada via transportadores de glicose do tipo GLUT2 (DELFINO *et al.*, 2002). A importância deste transportador deve ser considerada, já que a toxicidade da STZ afeta também outros órgãos que o expressam, como o fígado e os rins (ALI *et al.*, 2012). A presença de receptores GLUT2 nesses órgãos poderia explicar, por exemplo, o surgimento de tumores hepáticos e renais em animais tratados com esta droga (THULESEN *et al.*, 1997). Por outro lado, Thulesen e colaboradores relataram que o tratamento com insulina diminui a expressão de GLUT2 nas células beta

pancreáticas e previne a ação diabetogênica da STZ (THULESEN *et al.*, 1997).

Em contraste com GLUT2, a isoforma GLUT1 do transportador de glicose apresenta afinidade muito baixa para a STZ e é predominantemente expressa em humanos. Isto pode explicar por que células fetais humanas são resistentes ao efeito tóxico da STZ e por que pacientes com tumores endócrinos tratados com STZ não desenvolvem diabetes (THULESEN *et al.*, 1997).

Os efeitos biológicos da STZ podem ser atribuídos, além da sua similaridade com a glicose, à sua hidrofilia e capacidade de alquilação (ALI *et al.*, 2012). Intracelularmente, a ação da STZ parece envolver a produção de espécies reativas de oxigênio molecular capazes de promover alquilação de bases de ácido desoxirribonucléico (DNA) em vários níveis, as quais, quando reparadas, causam alterações letais no metabolismo de células beta por acarretarem depleção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (ALI *et al.*, 2012; DELFINO *et al.*, 2002; GOYARY & SHARMA, 2010). Recentes evidências sugerem que o óxido nítrico pode estar envolvido nesse mecanismo de citotoxicidade. De fato, ele participa da fragmentação de DNA vista em células apoptóticas e pode interagir com oxigênio para gerar hidroxila. Em adição, nitrito pode ser liberado por decomposição espontânea da STZ e acarretar produção de óxido nítrico.

A STZ pode ocasionar citotoxicidade tanto quando administrada uma única vez em alta dose, bem como quando administrada em baixas doses por cinco dias consecutivos. Estudos em ratos com diferentes vias de administração de STZ mostraram que a dose de 60 mg/Kg por via sublingual ou intravenosa (veia da cauda) promove diabetes grave e estável por 40 semanas. Com essa dose, porém, pode ocorrer toxicidade sistêmica após a aplicação da droga pela veia sublingual (DELFINO *et al.*, 2002). A administração de STZ por via intraperitoneal na dose de 45 mg/Kg promove diabetes leve e instável enquanto que na dose de 60 mg/Kg induz diabetes duradouro em 100% dos animais (DELFINO *et al.*, 2002; THULESEN *et al.*, 1997).

A grande utilização do modelo de diabetes induzido por STZ justifica-se pela capacidade de mimetizar quadros patológicos observados em pacientes diabéticos como hiperglicemia, poliúria (GOYARY & SHARMA, 2010; JUNOD *et al.*, 1969), polifagia (GOYARY & SHARMA, 2010), redução da velocidade de condução nervosa motora e sensorial (KALICHMAN *et al.*, 1998), hiperalgesia e alodinia em resposta a estímulos de diferentes naturezas (SUN *et al.*, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2009). Na

literatura, no entanto, ainda é controverso se em modelos de dor neuropática diabética por STZ há perda neuronal em tecidos nervosos sensoriais ou autonômicos. Nesse sentido, tem sido descrito que gânglios da raiz dorsal extraídos de ratos diabéticos por STZ em diferentes estágios da doença possuem redução do número de neurônios sensoriais (SCHMEICHEL *et al.*, 2003; SRINIVASAN *et al.*, 2000). Entretanto, essa perda neuronal em gânglios da raiz dorsal não foi claramente observada por outros estudos (KISHI *et al.*, 2002; SANGO *et al.*, 2002).

1.9 HIPERALGESIA EM DIABETES EXPERIMENTAL

A literatura frequentemente reporta que a administração sistêmica de STZ induz o diabetes, bem como vários dos sintomas associados a essa patologia, inclusive a dor neuropática diabética. Nesse sentido, diversos estudos têm reportado o desenvolvimento de hiperalgesia térmica, mecânica (BISHNOI *et al.*, 2011; CHRISTOPH *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2009; IKEDA *et al.*, 2009) e química na pata de animais após o tratamento dos animais com STZ (HASANEIN, 2011; PABREJA *et al.*, 2011). Portanto, esse modelo de diabetes permite avaliar esta condição, bem como os efeitos de drogas com potencial analgésico na dor neuropática diabética.

Alghren & Levine, utilizando um analgesímetro, observaram o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica na pata de animais na quarta semana após indução do diabetes pela STZ (AHLGREN & LEVINE, 1993). Em concordância com estes dados, Calcutt & Chaplan, utilizando filamentos de von Frey, relataram o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica na pata de animais 6 semanas após o tratamento com STZ. O tratamento com insulina foi capaz de prevenir o desenvolvimento desta condição, sugerindo que é pouco provável que a hiperalgesia ocorra em função de uma toxicidade da STZ e parece ser secundária à deficiência de insulina e suas consequências. Neste estudo, o tratamento com morfina foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica de forma dose-dependente. (CALCUTT & CHAPLAN, 1997). Por meio do mesmo método, Lynch e colaboradores observaram hiperalgesia mecânica na pata dos animais entre as semanas 7 e 14 pós-STZ. Neste estudo, o tratamento com morfina também foi capaz de aumentar o limiar mecânico do grupo diabético em relação ao grupo controle de forma dependente da dose (LYNCH *et al.*, 1999).

Cunha e colaboradores avaliaram 3 diferentes doses de STZ (10, 20 e 40 mg/Kg) e observaram que somente a maior dose foi capaz de induzir um aumento significativo nos níveis de glicose sanguínea dos animais. Entretanto, todos os animais tratados com STZ (hiperglicêmicos ou não) desenvolveram hiperalgesia mecânica bilateral na pata, a qual foi reduzida pelo tratamento sistêmico com morfina, mas não foi prevenida pelo tratamento com insulina, sugerindo que esta condição não é exclusivamente dependente da hiperglicemia (CUNHA *et al.*, 2009). Corroborando esses dados, Bishnoi e colaboradores, utilizando filamentos de von Frey e fonte de calor radiante, reportaram hiperalgesia mecânica e térmica na pata de ratos nas semanas 4 e 5 e de 1 a 5 pós-STZ, respectivamente. Neste estudo, o desenvolvimento de hiperalgesia ocorreu independentemente do estado glicêmico pós-STZ e foi correlacionado com um aumento da expressão do receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) e dos níveis de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) no cordão espinhal (BISHNOI *et al.*, 2011).

O estudo de Beyreuther e colaboradores reportou que 10 dias após a administração de STZ os animais desenvolveram hiperalgesia térmica ao frio e ao calor, sendo avaliada através dos testes de imersão em água a 4 °C e da placa quente a 38 °C. Vinte e um dias pós-STZ os animais apresentaram hiperalgesia mecânica e térmica ao calor, avaliada por meio dos testes de pressão da pata e da placa quente a 52 °C. O tratamento com PGB aumentou a latência (em s) nos testes da placa quente e o tratamento com morfina foi capaz de aumentar a latência para todos os estímulos (BEYREUTHER *et al.*, 2006). De forma semelhante, Fuchs *et al.*, utilizando o teste de Randall Selitto e fonte de calor radiante, observaram hiperalgesia mecânica e térmica na pata de ratos quatro semanas pós-STZ (FUCHS *et al.*, 2010).

Entre as semanas 2 e 4 pós-STZ, Pabreja e colaboradores observaram o desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao frio e ao calor na pata de animais, através do teste de imersão em água à $10 \pm 0,5$ °C e $47 \pm 0,5$ °C, respectivamente. Este estudo ainda reportou hiperalgesia térmica na cauda de animais no mesmo intervalo de tempo e uma resposta aumentada à formalina na segunda fase na quarta semana após tratamento com STZ (PABREJA *et al.*, 2011). Corroborando esses dados, outro estudo recente mostrou que ambas as fases da resposta à formalina na pata estavam aumentadas quatro semanas após indução do diabetes

por STZ (HASANEIN, 2011).

Recentemente, Taliyan & Sharma, através do emprego de filamentos de von Frey e do teste de Hargreaves, observaram hiperalgesia mecânica e térmica, respectivamente, na terceira semana após indução do diabetes. Este estudo reportou que o efeito antinociceptivo da morfina em animais diabéticos foi reduzido em relação ao grupo controle e que o pré-tratamento com talidomida (um inibidor de TNF- α) foi capaz de recuperar o efeito analgésico da morfina em ratos diabéticos (TALIYAN & SHARMA, 2012).

Os estudos acima citados demonstram que o modelo de indução de diabetes por STZ é capaz de induzir o desenvolvimento de hiperalgesia a estímulos de diferentes naturezas, validando a utilização do mesmo para a avaliação desta patologia e suas complicações.

Embora a maioria dos estudos avalie os efeitos do tratamento com a STZ nas alterações sensoriais na pata de animais, envolvendo, portanto, nervos espinhais, existem evidências de que o diabetes também possa gerar alterações no sistema sensorial trigeminal (TROGER *et al.*, 1999).

Nesse sentido, Rodella e colaboradores, utilizando uma fonte de calor radiante a 45 °C, relataram o desenvolvimento de hiperalgesia térmica na face de ratos nas semanas 8 e 12 após o tratamento com STZ. Importante ressaltar que o tratamento com insulina foi capaz de prevenir o desenvolvimento de hiperalgesia térmica na face dos animais, sugerindo que a hiperglicemia tem um papel importante no desenvolvimento desta condição. Neste estudo também foi avaliada a expressão da enzima óxido nítrico sintase em células do gânglio trigeminal e demonstrou-se que a alteração sensorial estava associada com redução da expressão desta enzima no gânglio, o que sugere redução da produção de óxido nítrico (RODELLA *et al.*, 2000). Corroborando essa observação, estudos anteriores já associaram um efeito antinociceptivo com o aumento da produção de óxido nítrico (SUZUKI *et al.*, 1999).

Considerando que apenas o estudo de Rodella e colaboradores avaliou, utilizando o modelo da STZ, as alterações sensoriais na face, e somente frente ao estímulo térmico, o presente estudo analisou sistematicamente o decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia ao calor, bem como de outras alterações a diferentes estímulos aplicados na face dos animais com diabetes experimental induzido por STZ. Para isso, torna-se fundamental o conhecimento das características anatômicas e da transmissão nociceptiva no sistema sensorial

trigeminal.

1.10 SISTEMA SENSORIAL TRIGEMINAL

A face e a cavidade oral são inervadas pelo nervo trigêmeo ou V par craniano que possui principalmente função sensorial. O nervo trigêmeo é composto por três ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular. O nervo oftálmico é puramente sensorial e inerva a porção frontal do crânio, órbita ocular, mucosas sinusais e cavidade nasal. O ramo maxilar inerva o lábio superior, porções laterais do nariz, parte da cavidade oral, mucosa da cavidade nasal, maxilar superior, palato e arcada dental superior. O ramo mandibular inerva estruturas como lábio inferior, bochechas, queixo, arcada dental inferior, gengiva, mucosa do maxilar inferior, assoalho da boca e os dois terços anteriores da língua (WAITE & ASHWELL, 2004). Os dois primeiros ramos do nervo trigêmeo são ramos sensoriais, enquanto que o ramo mandibular apresenta além de ramos sensoriais, ramos motores que inervam os músculos responsáveis pela mastigação (FRIED *et al.*, 2001).

Os neurônios que integram esses diferentes ramos do nervo trigêmeo apresentam uma morfologia pseudounipolar, caracterizada por um único axônio que se divide em um ramo periférico e um ramo central (THALAKOTI *et al.*, 2007). As mesmas características da inervação fornecida pelo nervo trigêmeo em humanos são observadas em ratos, bem como as mesmas ramificações periféricas principais (BENOLIEL & ELIAV, 2008).

As fibras responsáveis pela inervação periférica orofacial podem ser divididas em três tipos $A\alpha/A\beta$, $A\delta$ e C, as quais são responsáveis por detectar estímulos inócuos ou nocivos. São assim divididas por apresentarem diâmetros/calibres, velocidade de condução axonal e envolvimento na transmissão de informação de modalidades sensoriais diferentes (LAZAROV, 2002; SESSLE, 2000). As fibras $A\alpha$ e $A\beta$, responsáveis pela detecção de estímulos táteis e proprioceptivos, são altamente mielinizadas, calibrosas e apresentam elevada velocidade de condução (40-120 m/s). As fibras com terminações livres e responsivas a estímulos nocivos são chamadas de nociceptores e classificadas em fibras $A\delta$ e C. As fibras $A\delta$ possuem calibre e velocidade de condução intermediários (5-35 m/s); enquanto que as fibras não mielinizadas, ou fibras C, são de pequeno calibre e apresentam baixa

velocidade de condução (0,5-2 m/s) (DUBNER & BENNETT, 1983).

Os corpos celulares da maior parte dessas fibras sensoriais encontram-se no gânglio do trigêmeo, também denominado de gânglio semilunar ou gânglio de Gasser; enquanto que os corpos celulares das fibras motoras localizam-se no tronco cerebral, mais especificamente no núcleo mesencefálico do trigêmeo (DAVIES *et al.*, 2010; SESSLE, 2000).

Os neurônios periféricos que possuem seus corpos celulares no gânglio do trigêmeo atravessam o tronco cerebral ao nível da ponte, e se projetam para um complexo de núcleos sensoriais do trigêmeo (SESSLE, 2006). Este complexo pode ser dividido em núcleo sensorial principal, núcleo mesencefálico e núcleo do trato espinhal. O núcleo sensorial principal funciona como uma estação de retransmissão dos impulsos proprioceptivos das diversas regiões orofaciais. No núcleo mesencefálico localizam-se os corpos celulares dos ramos periféricos motores. Nessa região, os neurônios projetam-se para o núcleo motor ou para núcleos adjacentes e ativam interneurônios envolvidos na função do reflexo craniofacial. Os neurônios que fazem sinapse no núcleo do trato espinhal participam principalmente da transmissão dos estímulos periféricos nocivos para os neurônios de segunda ordem.

O núcleo do trato espinhal é subdividido em três diferentes subnúcleos, da parte rostral para a caudal: *oralis*, *interpolaris* e *caudalis* (SESSLE, 2000, 2006). Estes subnúcleos possuem a capacidade de intercomunicação, pois neurônios de um subnúcleo podem projetar-se para os outros subnúcleos (SESSLE, 2006).

O subnúcleo *caudalis* é uma das estruturas do tronco encefálico de grande importância para o processo nociceptivo orofacial, devido à sua peculiaridade anatômica e neuronal. Ele é o único subnúcleo que apresenta divisão laminar, assim como a medula espinhal. Sua principal função é o processamento da maioria das informações nocivas provenientes das regiões orofaciais, pois é neste subnúcleo, mais especificamente nas lâminas I, II, V e VI, que ocorrem as projeções da maioria das fibras A δ e C, responsáveis pela condução de estímulos nociceptivos (SESSLE, 2000, 2006). Além disso, este subnúcleo apresenta grande concentração de mediadores químicos (como substância P e glutamato) e receptores relacionados com a transmissão nociceptiva, bem como de mediadores químicos, como 5 hidroxitriptamina (5-HT), encefalina e ácido gama-aminobutírico (GABA), envolvidos na modulação da dor (SESSLE, 2005).

Os neurônios de segunda ordem, presentes no núcleo do trato espinhal, quando ativados são responsáveis pela transmissão das informações nociceptivas para diferentes regiões do tálamo (SESSLE, 2006). O tálamo é uma das principais estruturas centrais envolvidas na condução dos estímulos nociceptivos. A partir dele, neurônios de terceira ordem projetam-se para o córtex cerebral resultando no processamento dos aspectos cognitivos e afetivos da dor (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Embora os mecanismos de controle endógeno da dor não sejam discutidos, é importante mencionar que a transmissão dos estímulos nociceptivos pode ser modulada por vias descendentes de origem no tronco cerebral, especialmente em estruturas como substância cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe e estruturas adjacentes ao bulbo rostral ventromedial que, através de conexões entre si e diferentes neurotransmissores, inibem ou facilitam a transmissão nociceptiva (JULIUS & BASBAUM, 2001; MALCANGIO & BOWERY, 1996).

As informações expostas acima indicam que a organização do sistema sensorial trigeminal apresenta algumas peculiaridades. Além disso, um número muito menos expressivo de estudos em modelos animais de diabetes tem avaliado as alterações sensoriais na face, em comparação com os estudos envolvendo nervos espinhais. Por outro lado, já foram padronizadas várias técnicas e modelos para o estudo das respostas nociceptivas e hiperalgésicas dos animais frente a estímulos de diferentes naturezas aplicados na face. Dentre os modelos propostos, é importante citar o teste de formalina orofacial, desenvolvido por Clavelou *et al*, em 1989, bem como as técnicas para avaliação da hiperalgesia térmica e mecânica utilizadas pelo nosso grupo e publicadas em estudos anteriores (CHICHORRO *et al*. 2006[a,b], 2009). Assim, o emprego de modelos e técnicas já padronizados permitirá a avaliação do desenvolvimento das alterações sensoriais na face após a indução do diabetes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações sensoriais orofaciais a estímulos de diferentes naturezas em ratos com diabetes induzido quimicamente por STZ. Além disso, realizar um estudo estereológico comparativo do gânglio trigeminal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Tendo como controle ratos normoglicêmicos, os objetivos específicos do presente estudo foram avaliar em ratos diabéticos:

- as respostas nociceptivas frente à formalina injetada na região orofacial;
- o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica orofacial em diferentes intervalos de tempo após a indução do diabetes;
- o desenvolvimento de hiperalgesia térmica (ao calor e ao frio) em diferentes intervalos de tempo após a indução do diabetes;
- a densidade volumétrica dos pericários em amostras de gânglio trigeminal;
- a influência do tratamento com PGB e da morfina na hiperalgesia orofacial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Em todos os experimentos foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*, machos, pesando entre 180-220 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração e água. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo 2 dias antes dos experimentos, agrupados em um número máximo de 4 animais por caixa. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura e durante a fase clara do ciclo. Os animais tratados com STZ tiveram o cepilho trocado diariamente. Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR, autorização número 534).

3.1.2 Reagentes, drogas e soluções

Foram empregados nesse estudo os seguintes reagentes, drogas e soluções:

- Citrato de sódio dihidratado (Sigma, Vienna, Áustria);
- Estreptozotocina (Santa Cruz Biotechnology Inc, Califórnia, USA);
- Pregabalina (Pfizer, São Paulo, Brasil);
- Morfina (Merk S.A. Indústrias farmacêuticas, São Paulo, Brasil);

A STZ foi dissolvida em solução tampão de citrato de sódio 10 mM, mantida em pH 4,5 e administrada por via intraperitoneal (i.p.). O veículo da PGB foi preparado como uma suspensão de 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) em solução salina estéril 0,9% e administrada por via oral (v.o.). O veículo da morfina consistiu de solução salina estéril 0,9%, sendo administrado por via subcutânea (s.c.).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Indução do diabetes

Após um período de jejum de 12 h, os animais receberam uma administração única de tampão citrato de sódio (grupo normoglicêmico controle; 10 mM, pH 4,5; 1 mL/Kg) ou STZ (grupo diabético; 50 mg/Kg, dissolvida em tampão citrato de sódio), ambos por via intraperitoneal. Na sequência, os animais permaneceram em jejum por mais duas horas. Para confirmação do diabetes, três dias após essa administração, foi realizada a medida da glicose sanguínea utilizando 1 gota de sangue coletado da cauda do animal por lancetamento, por meio do kit ACCU-CHEK ACTIVE elaborado pela Roche (Alemanha). O diabetes foi caracterizado por níveis de glicose sanguínea ≥ 250 mg/dL. Níveis de glicose sanguínea foram também mensurados no final de cada experimento, nas semanas 4 ou 5 após a indução do diabetes. Um grupo de animais controle (normoglicêmicos) também teve os níveis de glicose sanguínea mensurados nos mesmos períodos.

3.2.2 Avaliação do peso corporal

Os animais foram pesados antes dos tratamentos e uma vez por semana até a quinta semana após serem tratados com veículo (tampão citrato) ou STZ a fim de se avaliar diferenças no ganho de peso entre os animais dos dois grupos.

3.2.3 Teste da formalina

Este teste foi baseado no estudo de Clavelou (CLAVELOU *et al.*, 1989). Cada animal foi previamente habituado em caixa de acrílico transparente, medindo 35x35x35 cm, por aproximadamente 15 min. Subsequentemente, os animais receberam uma injeção subcutânea de veículo (solução salina estéril 0,9%, 50 μ L) ou formalina (1%, 50 μ L) no lábio superior direito. Imediatamente após a injeção os animais foram colocados nas caixas de observação e o tempo de *grooming* facial

bilateral foi registrado em intervalos consecutivos de 3 min totalizando 30 min. A primeira e segunda fase da resposta à formalina foram consideradas de 0-3 e de 12-30 min após a injeção de formalina, respectivamente. Esse teste foi realizado na primeira, segunda e quarta semanas após indução do diabetes em diferentes grupos de animais. Na semana 4 após a STZ, um grupo adicional de animais recebeu uma injeção subcutânea de formalina (0,5%, 50 μ L) no lábio superior direito e o tempo de *grooming* facial foi avaliado durante 30 min, conforme descrito acima. Como a concentração de 1% é considerada submáxima no que diz respeito à indução do comportamento de *grooming* facial, foi hipotetizado que ela pudesse ser alta o suficiente para impedir a percepção de uma diferença entre os grupos (já que se esperava que o grupo diabético fosse mais responsivo a este estímulo) e por isso a dose foi reduzida.

3.2.4 Estimulação mecânica

Para a aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram habituados por pelos menos 2 horas em caixas de observação. Em seguida, foi realizada uma seleção dos animais previamente ao tratamento com STZ, a qual consistiu na aplicação em ordem crescente de 8 filamentos de von Frey (*Semmes-Weinstein monofilaments*, Stoelting, USA, 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g) na região de inserção das vibrissas, no lado direito da face. Cada filamento foi aplicado 3 vezes consecutivas com um intervalo de aproximadamente 30 s entre cada aplicação. Considerou-se o limiar de resposta dos animais à estimulação mecânica o filamento que evocou, por duas vezes, comportamentos como retirada rápida da cabeça, *grooming* facial e reações de ataque/escape. Apenas os animais que não apresentaram, na fase de seleção, estes comportamentos nociceptivos com a aplicação de todos os filamentos foram incluídos nos experimentos, isto é, aqueles que possuíam um limiar de resposta à estimulação mecânica igual ou superior a 8 g (CHICHORRO *et al.*, 2006a; CHRISTENSEN *et al.*, 1999). Para a análise do decurso temporal, os animais foram avaliados semanalmente até a quinta semana após o tratamento com STZ ou veículo.

Ainda, os mesmos animais testados nos experimentos de hiperalgesia mecânica orofacial tiveram o limiar mecânico das patas traseiras mensurado. Este

teste foi realizado utilizando o aparato de von Frey eletrônico, o qual consiste em um transdutor de força coberto por uma ponteira de polipropileno, acoplado a um analgesímetro digital (*electronic von Frey anesthesiometer, IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA*), como descrito previamente no estudo de Yamamoto *et al.*, 2009. Os animais foram ambientados em caixas de acrílico com o fundo metálico vazado por aproximadamente 15 min. Após esse período os animais cessam o comportamento exploratório e se encontram na posição adequada para a realização do experimento, quietos e apoiados em ambas as patas. Na sequência, com auxílio do aparato, foi feita a aplicação perpendicular de uma força crescente na superfície plantar das patas traseiras dos animais. Foi considerado o limiar mecânico a força (em g) necessária para promover respostas como retirada da pata ou fuga. Foram feitas 3 aplicações em cada pata, com intervalo de 3 min entre elas e a média dos valores das 6 aplicações das duas patas foi considerada o limiar mecânico para cada animal. Os animais foram submetidos a uma medida basal (pré-STZ) e foram avaliados semanalmente até a quinta semana após o tratamento com STZ ou veículo.

3.2.5 Estimulação térmica ao calor

Neste teste, os animais foram contidos pela mão do experimentador e uma fonte de calor radiante (aproximadamente 50 °C) foi posicionada a cerca de 1 cm da área de inserção das vibrissas, do lado direito da face. Em seguida, foi registrado o tempo de reação para que os animais afastassem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (CHICHORRO *et al.*, 2009). Foram incluídos nos experimentos apenas animais que apresentaram estas respostas entre 9 e 20 s a partir da aplicação do estímulo nas avaliações prévias ao tratamento com STZ ou veículo. O tempo de corte de 20 s para esse teste foi estipulado para evitar danos teciduais. Para avaliação do decurso temporal da hiperalgesia térmica ao calor após a indução do diabetes, o estímulo foi aplicado antes do tratamento com STZ e semanalmente até a quinta semana após o tratamento.

3.2.6 Estimulação térmica ao frio

Para a realização deste teste os animais foram previamente habituados em caixas de observação por aproximadamente 30 min e em seguida um spray de tetrafluoretano foi aplicado, por cerca de 1 s, a cerca de 1 cm da área de inserção das vibrissas, do lado direito da face. Imediatamente após a aplicação, o tempo despendido pelos animais executando *grooming* facial bilateral foi registrado durante 2 min (CHICHORRO *et al.*, 2006b). Foram incluídos nos experimentos animais cujo tempo de *grooming* facial foi ≤ 20 s antes do tratamento com STZ ou veículo. Para avaliação do decurso temporal da hiperalgesia térmica ao frio após a indução do diabetes, o estímulo foi aplicado antes do tratamento com STZ e semanalmente até a quinta semana após o tratamento.

3.2.7 Análise estereológica do gânglio trigeminal

Cinco semanas após o tratamento com veículo (tampão citrato, 1 mL/Kg, i.p.) ou STZ (50 mg/Kg, i.p.), os animais (n = 8 por grupo) foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral (15%, 3 mL/Kg) e perfundidos transcardiacamente com solução salina estéril 0,9% seguida de formol a 10%. Imediatamente após a perfusão, os animais foram decapitados, dissecados e tiveram seus gânglios do trigêmeo removidos. Os gânglios foram então submetidos ao processo de desidratação em série alcalina crescente em álcool 70%, 80%, 90%, 95%, seguida de 4 banhos em álcool absoluto. Em seguida, o material foi processado para diafanização em solução de álcool etílico 50% com xilol 50% e em 3 banhos em xilol. O material seguiu para 2 banhos de parafina durante 2 h cada para posterior emblocamento em resina. Após inclusão, com auxílio de um micrótomo Leits® todos os gânglios trigeminais foram submetidos a cortes longitudinais transversais oblíquos seriados com 7 μ m de espessura. Posteriormente, foram dispostos 12 cortes por lâmina histológica para serem submetidos à técnica histológica. As lâminas foram submetidas ao método de coloração histológica de Tricrômico de Masson, que consiste em: imersão em Hematoxilina Harris durante 1 min; lavagem em água corrente por 10 min; lavagem em água destilada; imersão em Fucsina Ácida de Ponceau por 1 min; imersão em

Ácido fosfomolibdico por 3 min; imersão em Azul de Anilina por 3 min; imersão em água destilada e acética 1% por 1 min; imersão em Álcool Acético por 1 min. Essas etapas foram seguidas de reidratação das amostras, por imersão em álcool 95%, 3 banhos de 5 min cada em álcool etílico absoluto e 1 banho com solução de álcool etílico com xilol 50% por 5 min; seguida de 3 banhos de xilol. Por fim, as lâminas foram montadas em resina Permout. Todas as lâminas foram analisadas no microscópio óptico Olympus BX40, utilizando objetivas de 22 mm de diâmetro e aumento de 100x. As imagens foram fotodocumentadas com auxílio de um Sistema de captura de imagem Olympus DP71®.

A análise estereológica foi realizada por meio da quantificação do número de corpos celulares de neurônios (pericários) existentes dentro de uma área teste conhecida. Para isso, foram utilizadas 24 secções seriadas de 7 µm de espessura por gânglio trigeminal (48 secções por animal), das quais cinco regiões em cada secção foram analisadas aleatória e sistematicamente, totalizando 240 áreas teste de análise por animal, correspondendo a 1920 áreas por grupo.

Os cálculos de volumetria dos gânglios trigeminais foram obtidos por meio de planimetria por contagem de pontos, sistema teste M42 (“Multipurpose Test System”) contendo 42 pontos-teste totais (PT), de acordo com Mandarim-de-Lacerda (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). Por meio da contagem de pontos-teste (PP) e intersecções dos pericários com a linha-teste foi determinado o parâmetro estereológico de densidade volumétrica dos pericários (Vv), segundo a fórmula:

$$Vv (\%) = (PP/PT) \cdot 100.$$

3.2.8 Campo aberto (*Open Field*)

A atividade locomotora foi avaliada no teste de campo aberto conforme descrito por Chioca e colaboradores (CHIOCA *et al.*, 2008). Foi utilizada uma arena retangular (50x40x63 cm), com piso dividido em 6 quadrantes iguais. Os animais foram colocados individualmente no canto inferior esquerdo da arena e o número de quadrantes cruzados, isto é a passagem do animal com as duas patas traseiras para o próximo quadrante, foi contabilizado manualmente durante 5 min. O número de cruzamentos no campo aberto foi usado como um índice primário da atividade locomotora.

3.2.9 Protocolos experimentais

Após a avaliação do desenvolvimento e decurso temporal das alterações sensoriais orofaciais após indução do diabetes, foram estabelecidos os protocolos de tratamento. Portanto, com base nesses resultados, nos experimentos seguintes foi avaliada a influência do tratamento sistêmico dos animais com PGB (10 e 30 mg/Kg, v.o.) e morfina (2,5 mg/Kg, s.c.) na hiperalgesia térmica ao calor e ao frio na quarta ou quinta semanas após a indução do diabetes por STZ. Para isso, inicialmente foi avaliada a responsividade basal dos animais aos estímulos térmicos (frio e calor, conforme descrito acima), e os mesmos receberam veículo ou STZ (também de acordo com a descrição acima). Na semana 4 ou 5 após esses tratamentos, período em que a hiperalgesia térmica está bem estabelecida, os animais foram tratados com PGB (10 ou 30 mg/Kg, v.o.), morfina (2,5 mg/Kg, s.c.) ou os veículos correspondentes (1 mL/Kg). Nos animais que receberam PGB, a hiperalgesia térmica (calor e frio) foi avaliada em intervalos de 1 hora da primeira à sexta hora, e novamente na vigésima quarta hora após o tratamento. Nos animais tratados com morfina, a hiperalgesia térmica (calor e frio) foi avaliada nos primeiros 30 min e em intervalos de uma hora da primeira à sexta hora após o tratamento. As doses de PGB e morfina utilizadas nesse estudo basearam-se nos estudos desenvolvidos por Yamamoto *et al.*, 2009 e Chichorro *et al.*, 2009, respectivamente.

A influência destes tratamentos também foi avaliada no teste de campo aberto, o qual foi realizado 3 horas após o tratamento com PGB e 30 min após o tratamento com morfina, intervalos de tempo em que ambas as drogas apresentaram efeitos anti-hiperalgésicos consistentes.

3.2.10 Análise Estatística

Para análise dos parâmetros de peso corporal e níveis de glicose sanguínea foi utilizado o teste *t* de *Student*, e esses dados foram obtidos de 6 a 15 animais por grupo. Esse mesmo teste estatístico foi empregado para avaliação do decurso temporal da hiperalgesia térmica e mecânica ($n = 6$ a 13 animais por grupo) e do teste de formalina a 0,5% ($n = 5$ a 6 animais por grupo). Os resultados do estudo estereológico também foram analisados por teste *t* de *Student* ($n = 8$ animais por

grupo).

Os resultados dos testes de formalina a 1% e campo aberto foram apresentados como média \pm erro padrão das médias (e.p.m.) de 5 a 11 animais por grupo e analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido por teste *post hoc* de Duncan.

Análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas foi empregada para avaliar estatisticamente a influência dos tratamentos na hiperalgesia térmica, sendo o tratamento considerado o fator independente e os diferentes tempos de comportamentos nociceptivos avaliados considerados as medidas repetidas. Em caso de diferenças significativas no fator independente e/ou na interação entre o fator independente e os fatores repetidos, análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste *post hoc* Duncan foi aplicado. Em todas as análises, valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE GLICOSE E NO PESO CORPORAL

Não houve alteração nos níveis de glicose dos animais controle na primeira e na quinta semana após a administração do veículo (tampão citrato 1 mL/Kg, pH 4,5, via i.p.). Entretanto, nos animais tratados com STZ (50 mg/Kg, via i.p.) foram detectados níveis glicêmicos superiores a 250 mg/dL e estatisticamente diferentes dos animais controle já na primeira semana após o tratamento. Os mesmos também estavam elevados e diferentes dos níveis glicêmicos dos animais controle na quinta semana após o tratamento, caracterizando a indução do diabetes pela injeção de STZ (TABELA 1).

Em adição, animais controle apresentaram um aumento gradual do peso corpóreo durante as 5 semanas de observação, enquanto que o peso dos animais diabéticos permaneceu estável e significativamente menor dos animais do grupo controle, da semana 1 até a semana 5 (TABELA 1). É importante mencionar que tanto a glicemia quanto o peso dos animais de ambos os grupos não apresentavam diferença estatística antes dos tratamentos (dados não mostrados).

TABELA 1 – ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE GLICOSE E NO PESO CORPORAL

Tratamento	Tempo (semanas)	Níveis de glicose (mg/dL)	Peso corporal (g)
Normoglicêmicos (Veículo)	1	119,8 ± 5,902	254,3 ± 7,562
	2	n.d.	283,5 ± 7,363
	3	n.d.	304,1 ± 6,804
	4	n.d.	324,7 ± 7,786
	5	110,8 ± 3,936	346,3 ± 7,624
Diabéticos (STZ, 50 mg/Kg)	1	411,5 ± 16,360 *	225,3 ± 6,540 *
	2	n.d.	244,0 ± 7,708 *
	3	n.d.	252,8 ± 8,049 *
	4	n.d.	248,8 ± 9,154 *
	5	507,6 ± 25,520 *	261,0 ± 10,360 *

NOTA – Os níveis de glicose dos animais controle (tratados com veículo, tampão citrato, n = 6) ou dos animais com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ, 50 mg/Kg, n = 15) foram avaliados nas semanas 1 e 5 após os tratamentos. Os peso corporal dos animais controle (normoglicêmicos, n = 15) e diabéticos (n = 15) foram avaliados da semana 1 a semana 5 após os tratamentos. * indicam P ≤ 0,05 em relação ao grupo normoglicêmico e n.d. significa valores não determinados (teste t de Student).

4.2 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

A injeção de formalina 1% (50 μ L, via s.c.) no lábio superior dos animais normoglicêmicos aumentou significativamente o tempo de *grooming* facial na primeira fase de resposta nas semanas 2 e 4 e na segunda fase nas semanas 1, 2 e 4 em relação aos animais que receberam uma injeção de salina no lábio superior (50 μ L, via s.c.). De maneira similar, a injeção de formalina 1% (50 μ L, via s.c.) no lábio superior dos animais diabéticos aumentou significativamente o tempo de *grooming* facial na primeira e segunda fase de resposta à formalina 1% nas semanas 1, 2 e 4 em relação aos animais que receberam uma injeção de salina no lábio superior (50 μ L, via s.c.). No entanto, não houve diferença significativa no comportamento nociceptivo durante a primeira e segunda fase da formalina, nas semanas 1, 2 e 4, quando os grupos normoglicêmico e diabético foram comparados (FIGURAS 1A e 1B).

Adicionalmente, na quarta semana após a indução do diabetes por STZ, não foi observada diferença nas repostas nociceptivas induzidas por formalina 0,5% administrada no lábio superior dos animais (50 μ L, via s.c.) normoglicêmicos em relação aos diabéticos, tanto na primeira quanto na segunda fase (FIGURAS 2A e 2B, respectivamente).

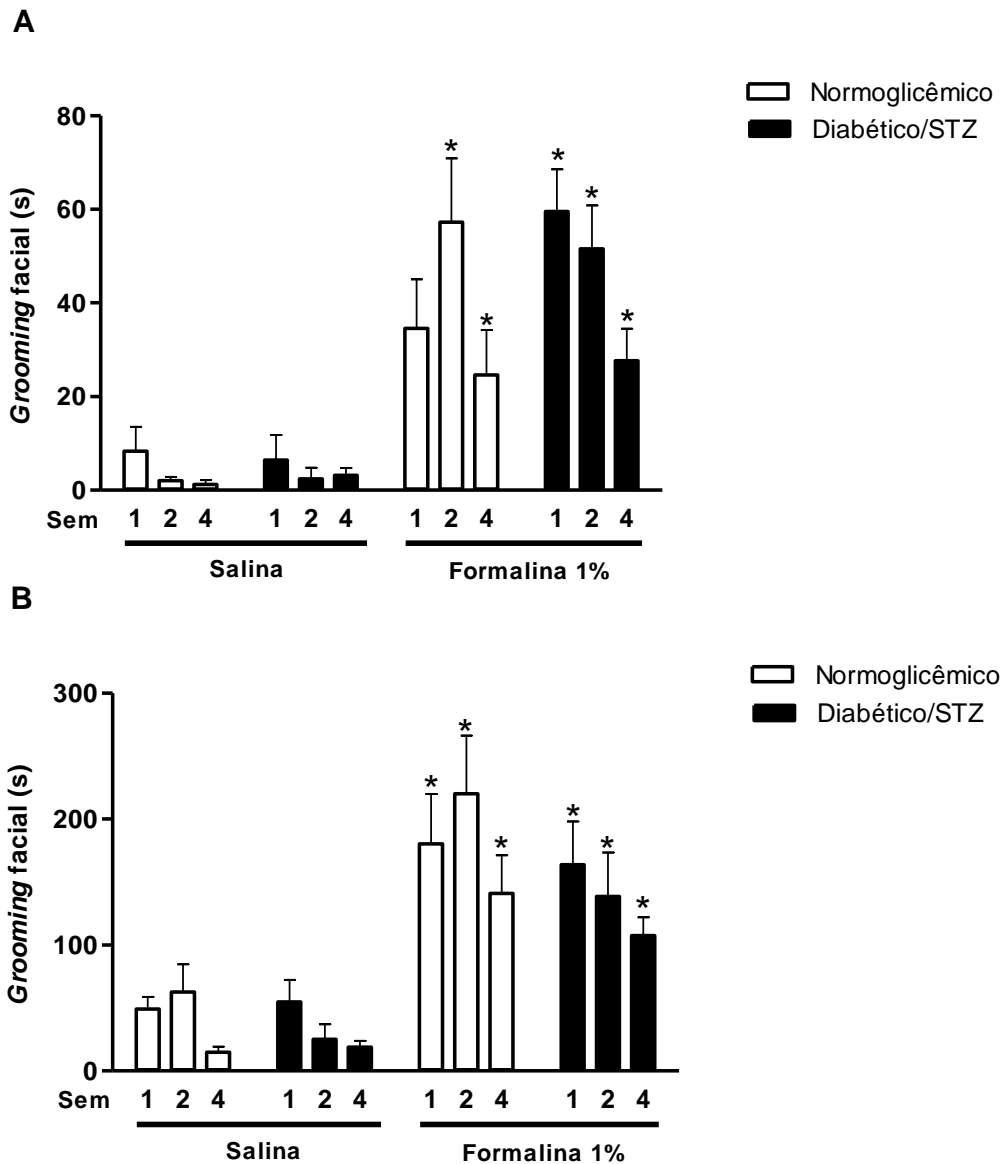


FIGURA 1 – COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL INDUZIDO POR FORMALINA A 1% EM ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS E DIABÉTICOS

Diferentes grupos de animais normoglicêmicos e diabéticos receberam uma injeção subcutânea de formalina (1%, 50 μ L) ou veículo (salina, 50 μ L) no lábio superior, 1, 2 e 4 semanas após a indução do diabetes e o tempo de *grooming* facial foi avaliado a cada 3 min durante 30 min. Os valores representam a média \pm e.p.m do tempo despendido pelos animais executando *grooming* facial na 1ª fase (0 – 3 min, painel A) e na 2ª fase (12 – 30 min, painel B) da nocicepção induzida por formalina (n = 5 a 9 ratos por grupo). * indicam $P \leq 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle (ANOVA de uma via, seguida por teste *post-hoc* de *Duncan*).

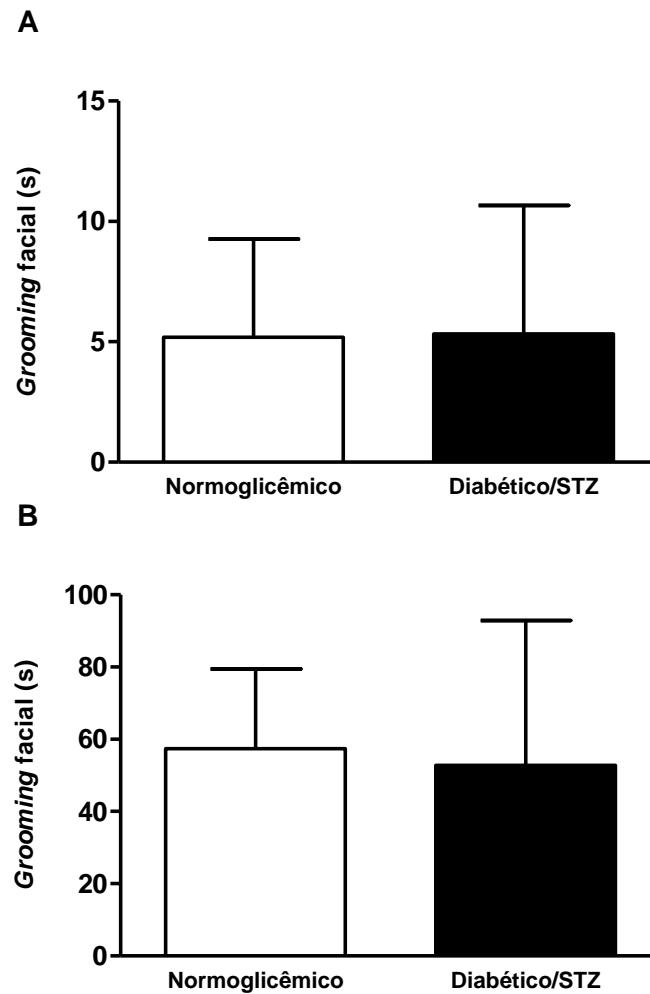


FIGURA 2 – COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL INDUZIDO POR FORMALINA A 0,5% EM ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS E DIABÉTICOS

Animais normoglicêmicos e diabéticos receberam uma injeção subcutânea de formalina (0,5%, 50 μ L) ou veículo (salina, 50 μ L) no lábio superior na semana 4 após a indução do diabetes e o tempo de *grooming* facial foi avaliado a cada 3 min durante 30 min. Os valores representam a média \pm e.p.m do tempo despendido pelos animais executando *grooming* facial na 1ª fase (0-3 min, painel A) e na 2ª fase (12-30 min, painel B) (n = 5-6 animais por grupo, teste *t* de Student).

4.3 LIMIAR MECÂNICO OROFACIAL E NA PATA DE RATOS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES

Animais diabéticos não apresentaram alterações no limiar mecânico, avaliado pela aplicação de monofilamentos de von Frey na face, ao longo das 5 semanas de avaliação quando comparados aos animais normoglicêmicos (FIGURA 3A). No entanto, os mesmos animais desenvolveram hiperalgesia mecânica na pata, avaliada através de von Frey eletrônico, quando comparados aos animais do grupo normoglicêmico, da semana 1 à semana 5 de avaliação (FIGURA 3B).

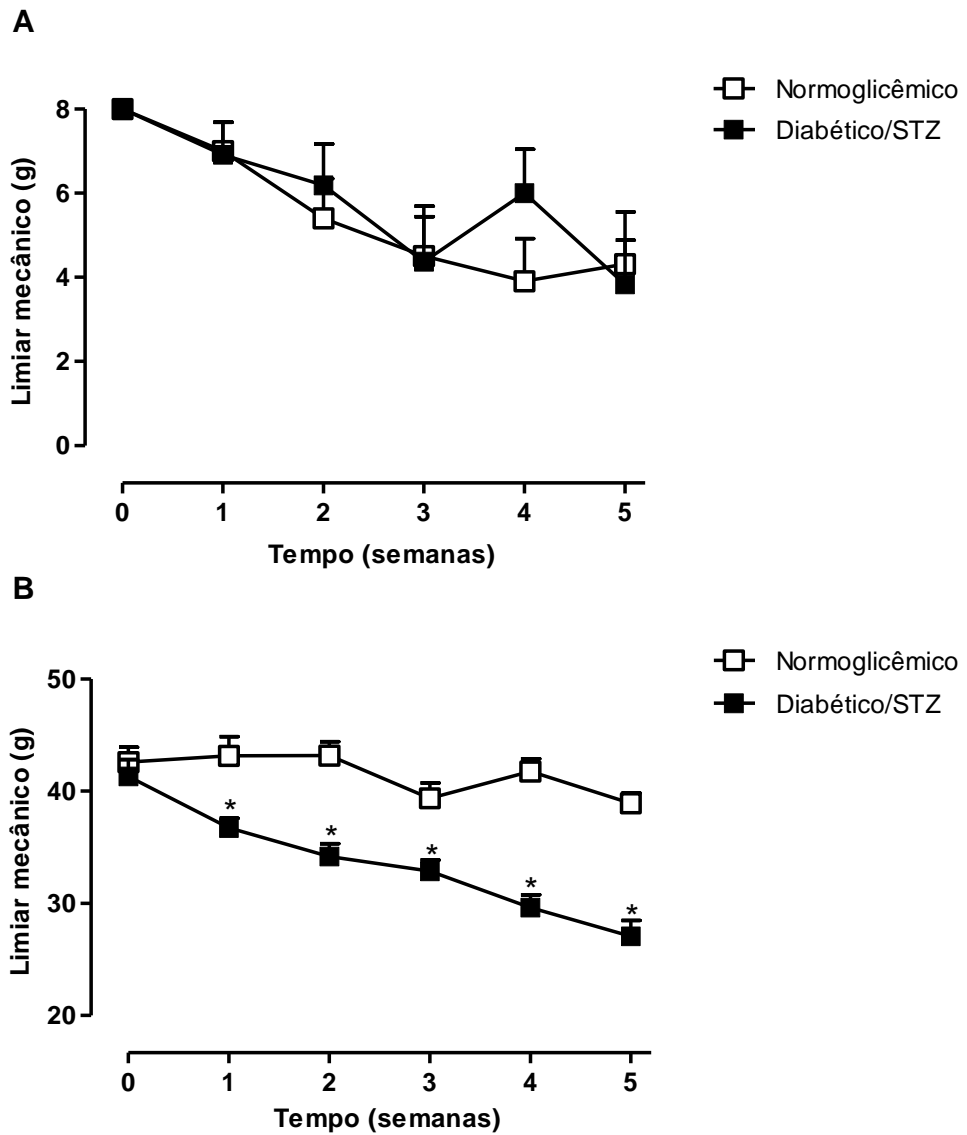


FIGURA 3 – AVALIAÇÃO DO LIMIAR MECÂNICO NA FACE E NA PATA APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES

O limiar mecânico na face (painel A) ou na pata (painel B) de animais foi avaliado antes (0) e uma vez por semana durante 5 semanas após a indução do diabetes, por meio de monofilamentos de von Frey ou de von Frey eletrônico, respectivamente. Os valores representam a média \pm e.p.m de 10 a 13 animais. * indicam $P \leq 0,05$ em relação ao grupo normoglicêmico (teste *t* de Student).

4.4 HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES

Os animais diabéticos desenvolveram hiperalgesia térmica ao calor, observada da primeira até a quinta semana após a STZ, e hiperalgesia ao frio, da segunda à quinta semana após a STZ (FIGURAS 4A e 4B, respectivamente).

A latência basal para resposta à aplicação da fonte de calor radiante na face dos animais normoglicêmicos foi de $8,9 \pm 0,6$ s, enquanto que para os animais diabéticos foi de $9,1 \pm 0,7$ s. Já na primeira semana após a indução do diabetes, a latência para resposta dos animais diabéticos foi significativamente reduzida (cerca de 30%) em relação ao grupo controle e reduções significativas na latência para resposta também foram observadas nas semanas 2, 3, 4 e 5, (FIGURA 4A), caracterizando o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor.

A hiperalgesia orofacial ao frio foi observada a partir da segunda até a quinta semana após a indução do diabetes por STZ. A resposta basal média ao estímulo frio foi de $9,1 \pm 1,3$ s para o grupo normoglicêmico e de $7,5 \pm 1,4$ s para o grupo diabético. Uma semana após, a aplicação do estímulo frio na face dos animais induziu o *grooming* facial durante $20 \pm 2,9$ s nos animais diabéticos, e durante $10,4 \pm 4,3$ s nos animais normoglicêmicos. Aumentos significativos do tempo de *grooming* facial foram detectados nas semanas 2, 3, 4 e 5 nos animais diabéticos quando comparados aos animais do grupo normoglicêmico (FIGURA 4B).

Não foram observadas diferenças na latência para resposta e no tempo de *grooming* facial entre as semanas 4 e 5 nos grupos de animais diabéticos e, portanto, a influência da PGB e morfina na hiperalgesia térmica foi avaliada na quarta ou na quinta semana após a STZ.

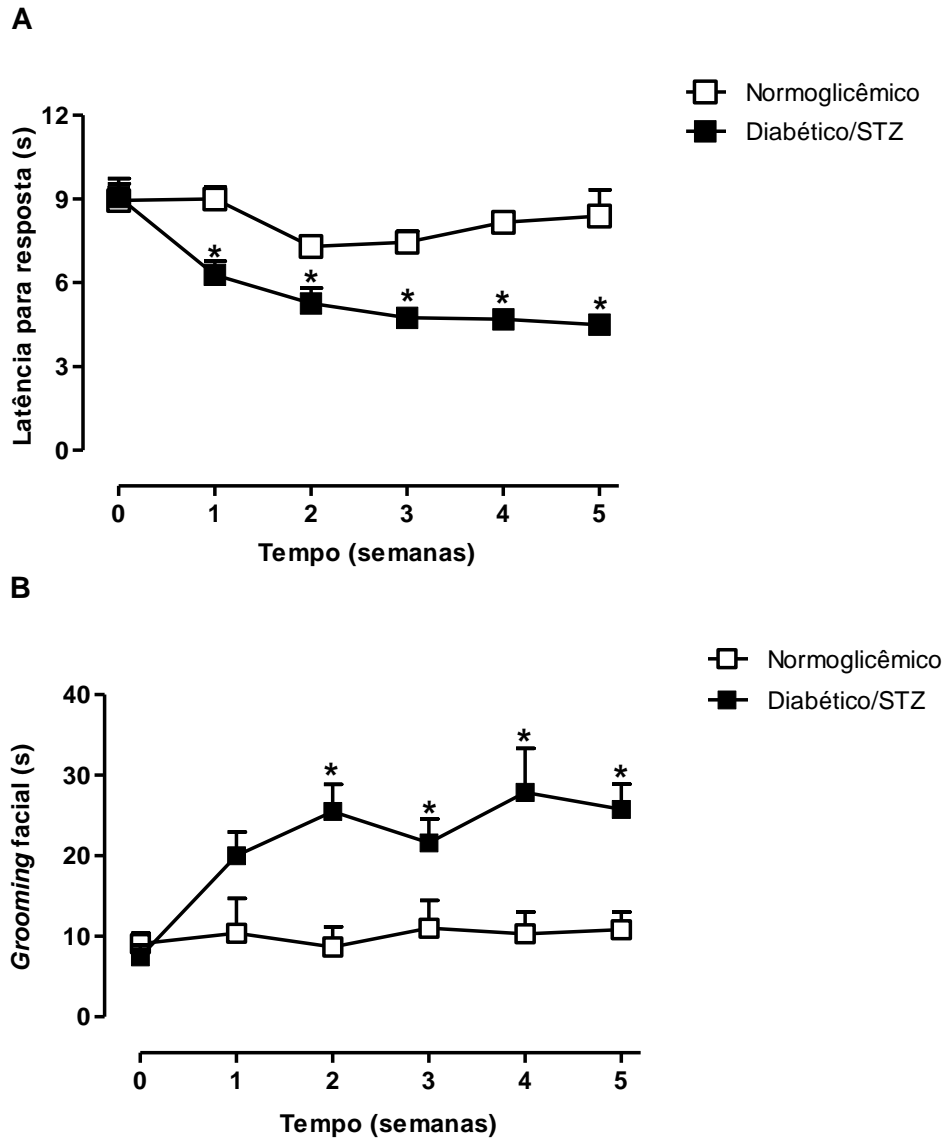


FIGURA 4 – DECURSO TEMPORAL DA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES

As respostas frente à estimulação pelo calor (painel A) ou pelo frio (painel B) aplicados na face dos animais foram avaliadas antes (0) e uma vez por semana durante 5 semanas após a indução do diabetes. Os valores representam a média \pm e.p.m da latência para resposta (painel A) ou do tempo de *grooming* facial (painel B) de 6 a 9 animais. * indicam $P \leq 0,05$ em relação ao grupo normoglicêmico (teste *t* de Student).

4.5 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DO GÂNGLIO DO TRIGÊMEO DE ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS E DIABÉTICOS

A análise esterológica do gânglio do trigêmeo de animais normoglicêmicos revelou que aproximadamente 43% do volume ganglionar correspondia a corpos celulares de neurônios (FIGURAS 5A e 5C). Já em animais diabéticos, a estereologia dos gânglios do trigêmeo coletados 5 semanas após a STZ, indicou perda neuronal, pois o volume do gânglio ocupado por corpos celulares passou a ser de 22% (FIGURAS 5B e 5C).

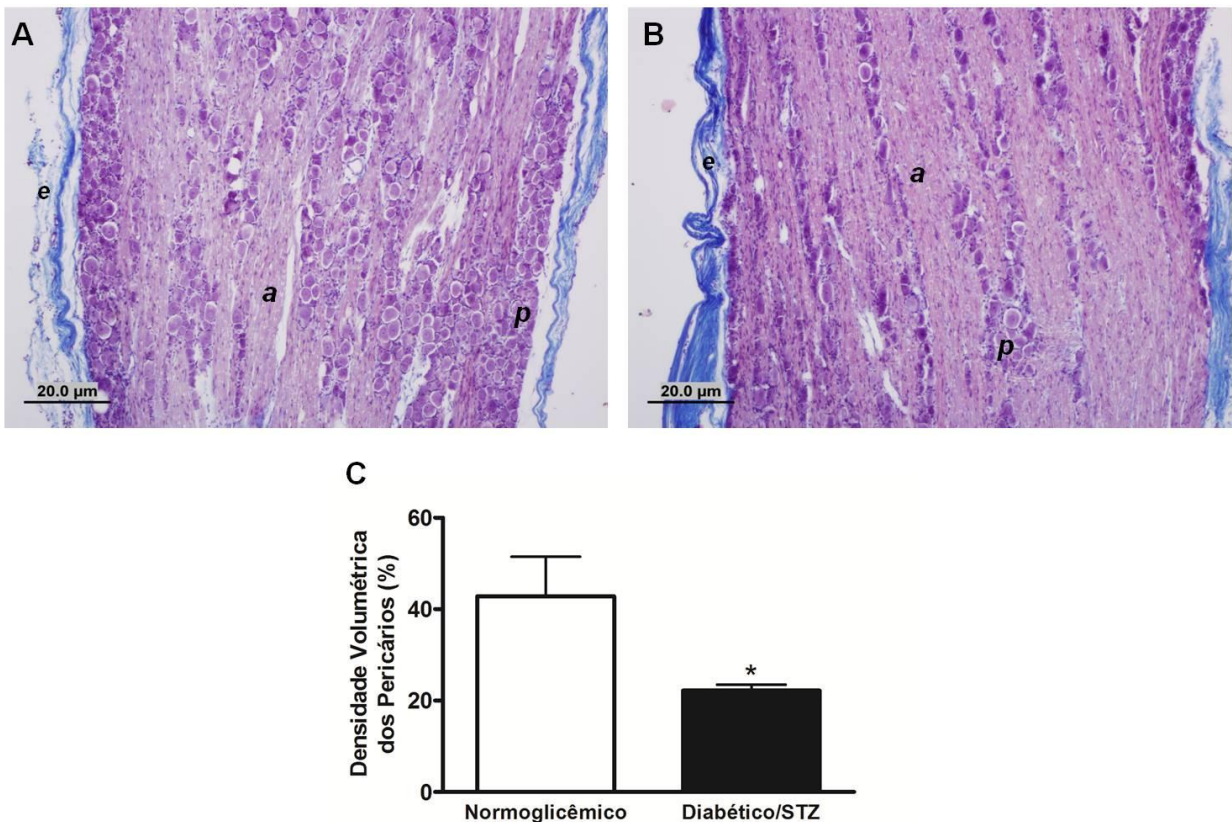


FIGURA 5 – ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DO GÂNGLIO DO TRIGÊMEO EM ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS E DIABÉTICOS

Na semana 5 após o tratamento com veículo (tampão citrato, 1 mL/Kg, i.p.) ou STZ (50 mg/Kg, i.p.), os gânglios do trigêmeo dos animais (n = 8 por grupo) foram removidos e as amostras foram processadas para coloração de Tricrômico de Masson. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio óptico em aumento de 100x, fotodocumentadas e submetidas à análise estereológica para quantificação do número de corpos celulares de neurônios (pericários). Os painéis A e B correspondem a imagens representativas do gânglio do trigêmeo de animais normoglicêmicos (A) e diabéticos (B), e as letras **e**, **a** e **p** indicam **epineuro**, **axônios** e **pericário**, respectivamente. O painel C ilustra o percentual do volume ocupado pelos pericários no gânglio do trigêmeo de animais normoglicêmicos e diabéticos. Os valores representam a média ± e.p.m da densidade volumétrica dos pericários em 1920 áreas analisadas por grupo (* indica $P \leq 0,05$, teste *t* de Student).

4.6 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM PREGABALINA E MORFINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL EM ANIMAIS DIABÉTICOS

Animais diabéticos que receberam tratamento sistêmico via oral com PGB na dose de 30 mg/Kg, mas não na dose de 10 mg/Kg, nas semanas 4 ou 5 após a indução do diabetes, exibiram um aumento marcante da latência para resposta à aplicação do calor na face. O efeito anti-hiperalgésico da PGB foi detectado 1 hora após sua administração e persistiu durante 6 horas. A PGB administrada na dose mais alta utilizada (30 mg/Kg, v.o.) não modificou a latência basal para resposta dos animais normoglicêmicos (FIGURA 6A). O tratamento dos animais diabéticos com morfina (2,5 mg/Kg, via s.c.) também promoveu uma redução proeminente e significativa da hiperalgésia ao calor, nas semanas 4 e 5, porém de curta-duração (somente 30 min e 1 hora após a administração). Assim como a PGB, a administração de morfina também não modificou a latência basal para resposta dos animais normoglicêmicos (FIGURA 6B).

A hiperalgésia ao frio avaliada nas semanas 4 ou 5 após a indução do diabetes por STZ foi afetada de maneira semelhante pela PGB (30 mg/Kg, v.o.), a qual promoveu um efeito anti-hiperalgésico nos animais diabéticos a partir da 1ª hora até a 6ª hora após o tratamento, quando comparado ao grupo controle tratado com veículo. O tratamento dos animais diabéticos com PGB na dose de 10 mg/Kg reduziu a hiperalgésia orofacial ao frio somente na 4ª e 5ª hora após a administração em relação aos animais tratados com veículo (FIGURA 7A). O tratamento com morfina (2,5 mg/Kg, via s.c.) também foi efetivo em reduzir a hiperalgésia orofacial ao frio, mas frente a este estímulo seu efeito foi ainda de menor duração (somente 30 min após a administração, FIGURA 7B). É importante ressaltar que nenhum dos tratamentos modificou o tempo de *grooming* facial dos animais normoglicêmicos (FIGURAS 7A e 7B).

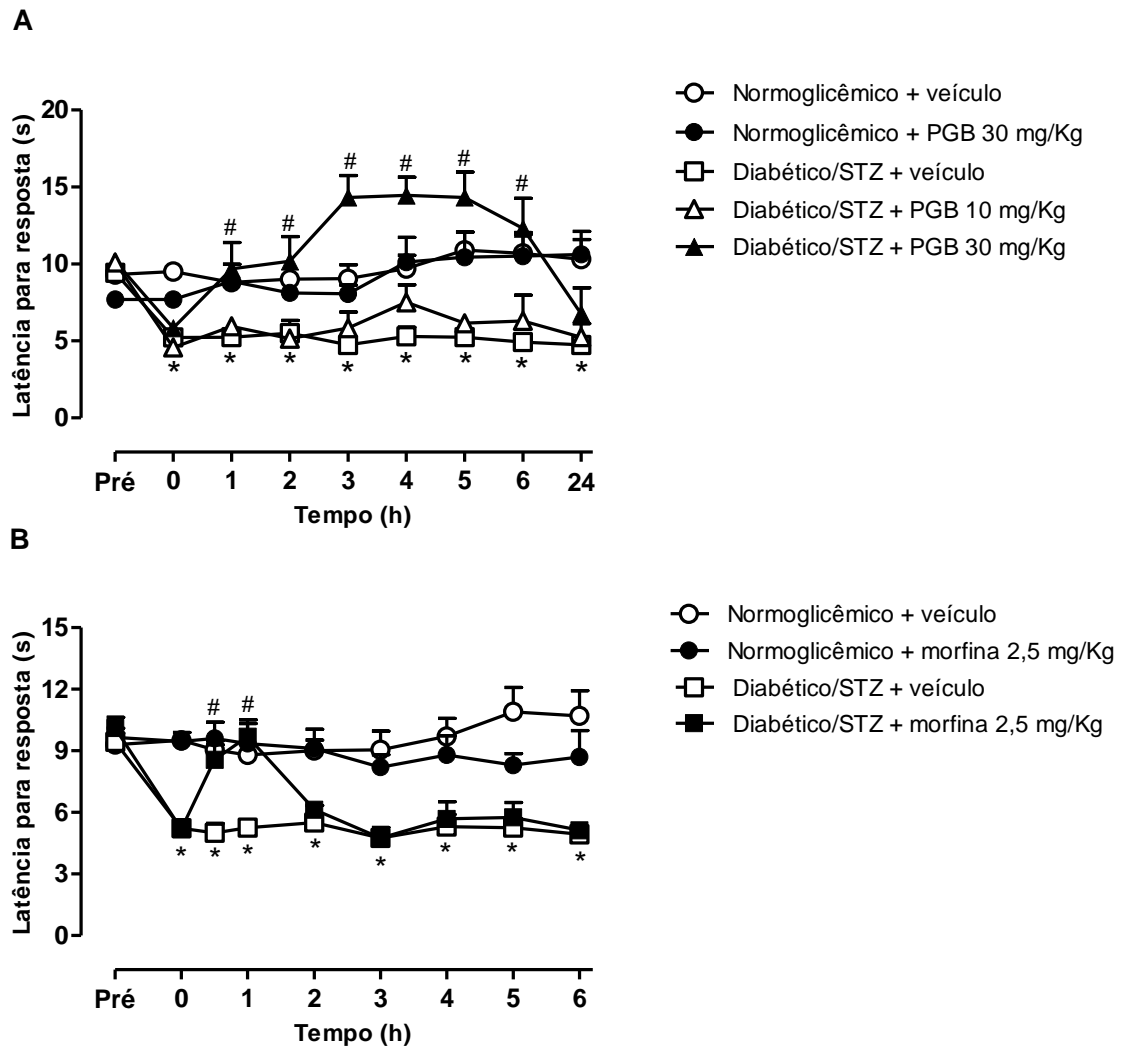


FIGURA 6 – EFEITO DA PREGABALINA E DA MORFINA NA HIPERALGESIA AO CALOR EM ANIMAIS DIABÉTICOS

Nas semanas 4 ou 5 após a indução do diabetes os animais foram tratados com PGB (10 e 30 mg/Kg, v.o., painel A) ou morfina (2,5 mg/Kg, s.c., painel B), ou com os veículos correspondentes (1 mL/Kg), e a hiperalgisia ao calor foi avaliada antes (0), em 30 min (painel B) ou a cada 1 hora durante 6 horas (painéis A e B) e novamente 24 horas (painel A) após os tratamentos. Os valores representam a média \pm e.p.m da latência para resposta de 8 a 10 animais. * e # indicam $P \leq 0,05$ em relação ao grupo normoglicêmico ou diabético tratados com veículo, respectivamente. A indicação “Pré” mostra a resposta basal antes do tratamento dos animais com STZ ou veículo (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida por teste *post-hoc* de *Duncan*).

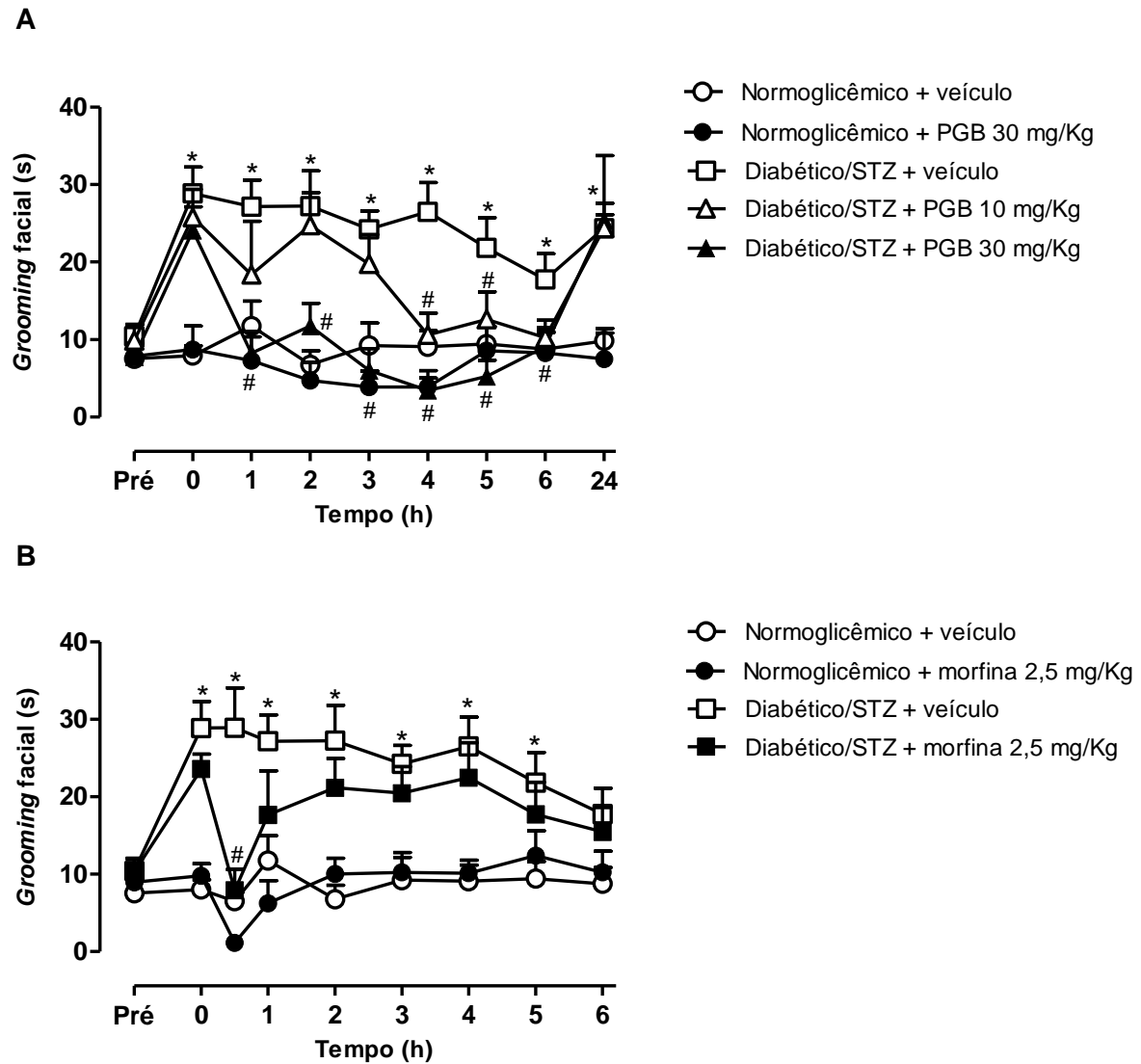


FIGURA 7 – EFEITO DA PREGABALINA E DA MORFINA NA HIPERALGESIA AO FRIO EM ANIMAIS DIABÉTICOS

Nas semanas 4 ou 5 após a indução do diabetes os animais foram tratados com PGB (10 e 30 mg/Kg, v.o., painel A) ou morfina (2,5 mg/Kg, s.c., painel B), ou com os veículos correspondentes (1 mL/Kg), e a hiperalgesia ao frio foi avaliada antes (0), em 30 min (painel B) ou a cada 1 hora durante 6 horas (painéis A e B) e novamente 24 horas (painel A) após os tratamentos. Os valores representam a média \pm e.p.m do tempo de *grooming* facial de 7 a 13 animais. * e # indicam $P \leq 0,05$ em relação ao grupo normoglicêmico ou diabético tratados com veículo, respectivamente. A indicação “Pré” mostra a resposta basal antes do tratamento dos animais com STZ ou veículo (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida por teste *post-hoc* de *Duncan*).

4.7 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS NO CAMPO ABERTO APÓS O TRATAMENTO COM PREGABALINA E MORFINA

Alterações comportamentais, assim como incoordenação motora e sedação, podem ser mal interpretadas como analgesia e produzir resultados falso-positivos (TABARELLI *et al.*, 2004). Para excluir esta possibilidade, foram avaliados os efeitos da PGB (30 mg/Kg, via i.p.) e da morfina (2,5 mg/Kg, via s.c.), nas doses e intervalos de tempo em que foram efetivas na hiperalgesia térmica, na atividade locomotora no teste do campo aberto.

Conforme mostrado na FIGURA 8, os tratamentos com PGB ou morfina não modificaram o número de cruzamentos no campo aberto em relação aos animais tratados com veículo, tanto no grupo dos animais normoglicêmicos quanto no grupo dos animais diabéticos.

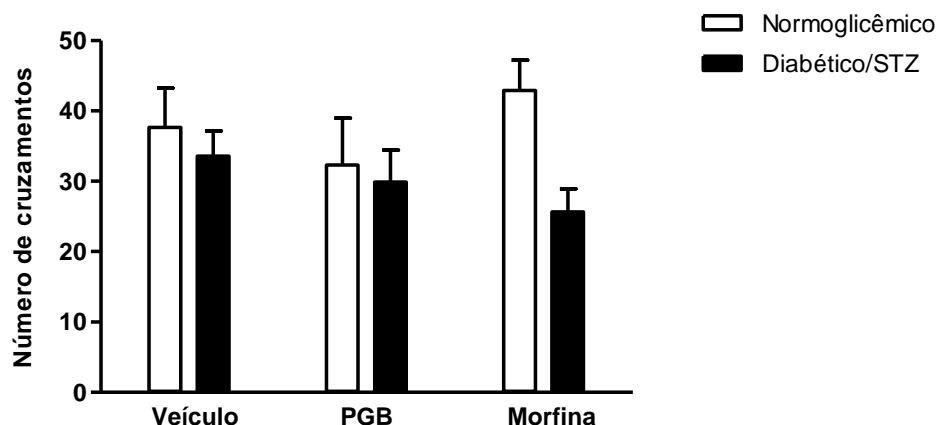


FIGURA 8 – EFEITO DA PREGABALINA E DA MORFINA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA AVALIADA NO TESTE DO CAMPO ABERTO

Nas semanas 4 ou 5 após a indução do diabetes os animais foram tratados com PGB (30 mg/Kg, v.o., 3 horas antes, painel A) ou morfina (2,5 mg/Kg, s.c., 30 min antes, painel B), ou com os veículos correspondentes (1 mL/Kg) e o número de cruzamentos no campo aberto foi contado manualmente durante 5 min. Os valores representam a média \pm e.p.m do número de cruzamentos de 8 a 11 animais (ANOVA de uma via seguida por teste *post-hoc* de *Duncan*).

5 DISCUSSÃO

Desde que a STZ demonstrou seletividade e citotoxicidade para as células beta pancreáticas tornando-se uma substância potencialmente diabetogênica, esta droga tem sido usada como um modelo experimental para estudo do diabetes e suas complicações (CARDENAS, 2005). A indução do diabetes por STZ é considerada um modelo animal para o estudo da dor neuropática diabética, sendo inclusive utilizada para a avaliação da eficácia de drogas com potencial analgésico nessa condição (CHRISTOPH *et al.*, 2010).

Vários estudos têm descrito que a administração sistêmica de STZ causa um aumento persistente dos níveis de glicose sanguíneos, bem como reduz substancialmente a taxa de crescimento dos animais, os quais mantêm seu peso estável por várias semanas após a indução do diabetes (BISHNOI *et al.*, 2011; FOX *et al.*, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 2009). Esses achados, também descritos no presente estudo, são considerados características do modelo de diabetes por STZ.

Além disso, a literatura frequentemente reporta que animais tratados com STZ desenvolvem hiperalgesia térmica, mecânica (BISHNOI *et al.*, 2011; CHRISTOPH *et al.*, 2010; FUCHS *et al.*, 2010; PABREJA *et al.*, 2011; TALIYAN & SHARMA, 2012) e química na pata (HASANEIN, 2011; PABREJA *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2007). Adicionalmente, hiperalgesia térmica orofacial já foi reportada utilizando este modelo (RODELLA *et al.*, 2000).

O presente estudo avaliou as alterações sensoriais orofaciais relacionadas ao diabetes induzido pela STZ. De forma interessante, nossos resultados não demonstraram alterações na resposta à formalina de animais diabéticos em relação ao grupo controle, bem como os animais tratados com STZ também não desenvolveram hiperalgesia mecânica orofacial. Por outro lado, após o tratamento com STZ, os animais desenvolveram hiperalgesia orofacial térmica ao frio e ao calor, que foi significativamente reduzida pelos tratamentos com morfina e PGB.

O teste da formalina é utilizado para investigar sensibilização espinhal em animais, mas também permite a investigação do processamento sensorial nas vias nociceptivas periféricas (RAMOS *et al.*, 2007). A resposta à aplicação subcutânea de formalina na pata ou na face de animais ocorre de forma bifásica, na qual a primeira fase (chamada de fase neurogênica) reflete a ativação de nociceptores, enquanto que a segunda fase (chamada de fase inflamatória) envolve uma inflamação local e

sensibilização central (BARROT, 2012; CLAVELOU *et al.*, 1995). As versões orofacial e na pata do teste da formalina permitem o estudo, utilizando diferentes parâmetros, de processos nociceptivos deflagrados pelo mesmo estímulo aplicado em diferentes regiões do corpo. Isto pode ajudar no entendimento das diferenças no processamento nociceptivo entre as regiões espinhal e trigeminal (RABOISSON & DALLEL, 2004).

No presente estudo a administração de formalina a 1% no lábio superior direito evocou uma resposta bifásica nas semanas 1, 2 e 4 após o tratamento com STZ ou veículo para ambos os grupos, diabético e normoglicêmico. Entretanto, não foi verificada diferença entre os mesmos. Estes dados não estão de acordo com alguns estudos, como o de Ramos e colaboradores, em que foi observado que a administração de formalina 0,5% na pata dos animais evocou um aumento no número de sacudidas da pata nas semanas 1, 2 e 4 para o grupo diabético em relação ao grupo controle (RAMOS *et al.*, 2007). Pabreja e colaboradores também relataram uma segunda fase aumentada para o grupo diabético após a administração de formalina 2% na pata, quatro semanas após a administração de STZ (PABREJA *et al.*, 2011). Dados recentes do nosso grupo mostram o desenvolvimento de hiperalgesia química na pata (por meio do teste da formalina 0,5%, 50 μ L) na quarta semana pós-STZ, com aumento da primeira e segunda fase (SCHREIBER *et al.*, 2012).

O estudo de Raboison & Dallel avaliou o comportamento nociceptivo de ratos após a administração subcutânea no lábio de formalina em concentrações que variaram de 0,2 a 10% e demonstrou que o tempo de *grooming facial* na segunda fase aumenta de forma concentração dependente até a concentração de 2,5%, enquanto que concentrações maiores são acompanhadas de uma redução na intensidade da resposta dos animais (RABOISSON & DALLEL, 2004). Corroborando esses dados, o estudo de Chichorro e colaboradores avaliou o comportamento nociceptivo de ratos após a injeção de formalina em concentrações que variaram de 0,63 a 5% aplicadas no lábio superior e reportou que de forma concentração dependente aumenta o tempo de *grooming facial* na primeira fase até a concentração de 5% e na segunda fase até a concentração de 2,5% (CHICHORRO *et al.*, 2006c). Com base nisso, para este estudo foi selecionada a concentração de 1% de formalina, a qual é considerada uma concentração submáxima no que diz respeito à indução do comportamento de *grooming facial*. Considerando que com o

emprego dessa concentração de formalina não observamos diferenças na responsividade dos animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos, também avaliamos as respostas à formalina 0,5% na semana 4 após a STZ. Entretanto, a administração de formalina 0,5% no lábio superior dos animais diabéticos também não evocou um aumento no tempo de *grooming* facial comparado ao grupo controle. Portanto, nossos dados sugerem que não há sensibilização do sistema sensorial trigeminal a este estímulo e reforçam a ideia de que o processamento nociceptivo no sistema trigeminal pode diferir daquele decorrente da ativação de nervos espinhais. Entre as diferenças observadas no processamento nociceptivo trigeminal e espinhal pode-se citar a densidade de receptores específicos, a organização anatômica (que se apresenta de forma laminar na medula espinhal, enquanto que o mesmo tipo de organização é observado somente no subnúcleo caudalis do núcleo sensorial trigeminal) e a proporção de fibras.

Juntamente com hiperglicemia e redução na velocidade de condução nervosa, a hiperalgesia mecânica é um dos sinais mais consistentes de neuropatia periférica em modelos animais de diabetes (DOBRETSOV *et al.*, 2003).

Utilizando o modelo de diabetes induzido pela STZ, muitos autores reportam uma hipersensibilidade a estímulos mecânicos logo nas primeiras semanas após tratamento com STZ. Chen & Pan, utilizando dois diferentes métodos de avaliação de hiperalgesia mecânica (filamentos de von Frey e teste de pressão na pata), observaram que ratos tratados com STZ desenvolveram hiperalgesia mecânica na segunda semana pós-STZ, mantendo o limiar mecânico reduzido até a sétima semana em relação ao grupo controle (CHEN & PAN, 2002). Esses dados corroboram vários outros estudos que detectaram hiperalgesia mecânica na pata, porém em diferentes intervalos de tempo após a indução do diabetes (TALIYAN; SHARMA, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2009).

Em concordância com estas observações, o presente estudo demonstrou que o tratamento com STZ resultou no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica na pata, observada entre as semanas 1 e 5. No entanto, o limiar mecânico para a aplicação dos filamentos de von Frey na região orofacial não foi diferente entre os grupos diabético e normoglicêmico, adicionando mais uma diferença nas alterações sensoriais detectadas em nervos espinhais e trigeminais. É importante mencionar que nosso grupo tem utilizado essa metodologia para avaliar hiperalgesia mecânica na face, a qual é detectada em outros modelos de indução de dor orofacial

(CHICHORRO *et al.*, 2006a). Esse fato, aliado à observação de hiperalgesia mecânica na pata dos mesmos animais que foram testados na face, sugere que não há uma interferência da metodologia.

Por outro lado, o tratamento com STZ induziu o desenvolvimento de hiperalgesia térmica orofacial ao calor e ao frio, com início nas semanas 1 e 2, respectivamente. Tanto a hiperalgesia ao calor quanto ao frio foram detectadas até a quinta semana pós-STZ.

A hiperalgesia térmica ao calor tem sido extensivamente relatada no modelo de diabetes induzido pela STZ. Utilizando o teste da placa quente com temperaturas em torno de 50 °C, alguns estudos demonstraram o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor na pata de animais nas semanas 1 e 3 após o tratamento com STZ (BEYREUTHER *et al.*, 2006; CHRISTOPH *et al.*, 2010; PABBIDI *et al.*, 2008b). Outros estudos, utilizando uma fonte luminosa de calor, relataram hiperalgesia ao calor na cauda de animais nas semanas 1 e 2 pós-STZ (KAMEI *et al.*, 2001; OHSAWA *et al.*, 2011).

Pabbidi e colaboradores, utilizando o teste da placa quente a $52 \pm 0,3$ °C, observaram o desenvolvimento de uma fase inicial de hiperalgesia ao calor na pata de animais entre as semanas 1 e 3 pós-STZ, seguida de uma fase de hipoalgesia entre as semanas 6 e 8 (PABBIDI *et al.*, 2008a). O desenvolvimento de hiperalgesia térmica seguida de uma fase de hipoalgesia tem sido relatado em vários modelos animais de diabetes tipo 1 e 2, incluindo o modelo de indução pela STZ. A hiperalgesia ao calor frequentemente tem sido descrita entre as semanas 2 e 8 após a indução do diabetes e parece envolver múltiplos mecanismos, tais como aumento da expressão e/ou atividade da aldose redutase, estresse oxidativo, entre outros. Por outro lado, a hipoalgesia ao calor tem sido descrita em fases mais tardias da doença (acima de 12 semanas) (OBROSOVA, 2009).

De acordo com Pabbidi e colaboradores, as fases de hiper e hipoalgesia são acompanhadas por aumento e diminuição da expressão de receptores TRPV1, respectivamente. Em adição, utilizando cultura de células do gânglio da raiz dorsal e técnicas de eletrofisiologia, esses autores demonstraram que as correntes alteradas para TRPV1 estavam correlacionadas com a sensibilidade alterada ao estímulo térmico em animais diabéticos (PABBIDI *et al.*, 2008b). Esses resultados sugerem uma importante participação de receptores TRPV1 na hiperalgesia ao calor em animais diabéticos.

Ainda nesse sentido, já foi demonstrado que a insulina é capaz de potencializar as correntes de membrana mediadas por TRPV1 em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal, por meio do aumento da sensibilidade desse receptor, bem como por meio da indução da sua expressão e translocação do citosol para a membrana plasmática (BUREN *et al.*, 2005). De acordo com esta observação, a fase de hipoalgesia poderia ser explicada pela deficiência de insulina, que está relacionada com uma diminuição da expressão de receptores TRPV1. Entretanto, a fase de hiperalgesia não pode ser prontamente compreendida. Segundo Pabbidi, é possível que após o tratamento com STZ ocorra uma redução abrupta nos níveis de insulina, levando a um aumento compensatório da expressão de TRPV1, resultando em hiperalgesia (PABBIDI *et al.*, 2008b).

Os receptores TRPV1 estão localizados em nervos sensoriais periféricos, especialmente em fibras C e A δ , e participam da ativação e/ou sensibilização dessas fibras em resposta a diferentes estímulos (TOMINAGA & CATERINA, 2004). Esses receptores têm sido considerados os principais responsáveis pelo desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor em diversos modelos de dor neuropática, bem como inflamatória (ZHANG *et al.*, 2005). Entretanto, sua participação na hiperalgesia orofacial ao calor após a indução do diabetes ainda precisa ser elucidada. Além disso, no presente estudo não foi investigada a ocorrência de hipoalgesia, uma vez que esta condição aparece em períodos mais tardios, sendo que esta questão ainda precisa ser avaliada.

Hiperlgesia ao frio também já foi reportada por alguns autores após a indução do diabetes por STZ. Courteix e colaboradores observaram o desenvolvimento de hiperlgesia ao frio, com o teste de imersão da cauda de ratos em água a 10°C, duas semanas após o tratamento com STZ, permanecendo o tempo de reação dos animais reduzido até a quarta semana após a indução do diabetes (COURTEIX *et al.*, 1993). No mesmo período pós-STZ, Pabreja e colaboradores observaram hiperlgesia térmica ao frio por meio do teste de imersão da pata de ratos em água a $10 \pm 0,5$ °C (PABREJA *et al.*, 2011). Esse conjunto de resultados indica que no modelo de diabetes por STZ, os ratos desenvolvem hiperlgesia ao frio, com início na segunda semana após indução do diabetes e duração de pelo menos duas semanas.

Alguns estudos recentes em animais têm proposto a participação de receptores de potencial transitório com domínios anquirina 1 (TRPA1) na

patofisiologia da dor associada à DPN (BARRIÈRE *et al.*, 2012; WEI *et al.*, 2009, 2010). O TRPA1 pode ser ativado direta ou indiretamente por diferentes estímulos, incluindo compostos pungentes e irritantes (cinamaldeído, acroleína, salicilato de metila, gingerol, eugenol, ilicina, entre outros), mediadores inflamatórios (i.e. bradicinina), bem como pelo frio nocivo (17 °C) (GARCÍA-AÑOVEROS & NAGATA, 2007). Nos gânglios da raiz dorsal, trigeminal e nodoso, receptores TRPA1 são altamente expressos em fibras de pequeno diâmetro (ANDRADE *et al.*, 2012; GARCÍA-AÑOVEROS & NAGATA, 2007).

De acordo com o estudo de Barrière e colaboradores, o desenvolvimento de hiperalgesia ao frio, avaliada na pata de ratos diabéticos esta relacionada a um marcante aumento na expressão (cerca de 45%) do RNA mensageiro para receptores TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal (BARRIÈRE *et al.*, 2012).

A hiperalgesia ao frio em animais diabéticos também tem sido relacionada ao estresse oxidativo, o qual se considera estar intimamente relacionado ao desenvolvimento das complicações do diabetes (OBROSOVA, 2009). Interessantemente, receptores TRPA1 podem ser ativados por peróxido de hidrogênio, produzido pela mitocôndria durante o estresse oxidativo, o que reforça ainda mais essa hipótese (BARRIÈRE *et al.*, 2012).

Em adição, existem evidências de que receptores TRPA1 participam do desenvolvimento da hiperalgesia mecânica em alguns modelos de dor neuropática (CASPANI *et al.*, 2009). Nesse sentido, Wei e colaboradores demonstraram que um antagonista de receptores TRPA1 foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica de animais com diabetes induzido pela STZ. Nesse mesmo estudo, outro grupo de animais diabéticos recebeu um tratamento prolongado com o antagonista e não desenvolveu hiperalgesia mecânica, sugerindo que este receptor está envolvido tanto no desenvolvimento quanto na manutenção desta condição em animais diabéticos. Os autores desse estudo sugerem ainda que compostos endógenos resultantes do estresse oxidativo, como o 4-hidroxinonal, ativam neurônios aferentes primários via TRPA1, contribuindo para a hipersensibilidade mecânica (WEI *et al.*, 2009). Além disso, alguns autores sugerem que receptores TRPA1 medeiam as respostas nociceptivas evocadas por formalina em ratos normoglicêmicos (MCNAMARA *et al.*, 2007), mas sua participação nessas respostas em ratos diabéticos ainda não foi explorada.

Embora no presente estudo não tenha sido reportado o desenvolvimento de

hiperalgesia mecânica orofacial ou respostas aumentadas à formalina em animais diabéticos, pode-se especular que a hiperalgesia térmica ao frio observada neste grupo tem relação com a ativação e/ou regulação de receptores TRPA1. Entretanto, outros estudos são necessários para esclarecer esta questão.

Diversos fatores têm sido associados com as alterações sensoriais observadas tanto em pacientes diabéticos quanto em modelos animais de diabetes. Vários autores postulam que alterações nos gânglios, especialmente no gânglio da raiz dorsal, contribuem para o desenvolvimento dessas alterações. Os gânglios seriam particularmente vulneráveis ao diabetes por diversas razões, inclusive por não estarem protegidos pela barreira hematoencefálica e por apresentarem maior demanda metabólica do que os troncos nervosos (ZOCHODNE *et al.*, 2001). Além disso, o estresse oxidativo parece ser mais severo nos gânglios do que nos nervos (NICKANDER *et al.*, 1994) e essas observações têm levado à hipótese de que os neurônios sensoriais representam um alvo primário do diabetes (SCHMEICHEL *et al.*, 2003). No modelo de diabetes induzido por STZ, poucos estudos avaliaram a perda neuronal e sua implicação nas alterações sensoriais. Os dados deste estudo mostram, pela primeira vez, perda de neurônios sensoriais do gânglio trigeminal em animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos e nos permitem especular que tais alterações podem estar relacionadas com as alterações sensoriais detectadas na face, bem como com a ausência do desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e química nesta região. Alguns autores não têm relatado perda neuronal no gânglio da raiz dorsal após a STZ (SANGO *et al.*, 2002). Kishi e colaboradores também não detectaram redução significativa no número de neurônios do gânglio da raiz dorsal após a STZ, considerando todas as diferentes populações neuronais. Entretanto, esses autores observaram redução significativa na subpopulação de neurônios de grande diâmetro (KISHI *et al.*, 2002). Por outro lado, segundo Schmeichel e colaboradores já no primeiro mês após a indução do diabetes por STZ há um aumento da taxa de apoptose dos neurônios do gânglio da raiz dorsal, a qual persiste por até 12 meses após a indução do diabetes e tem relação com o desenvolvimento da neuropatia sensorial (SCHMEICHEL *et al.*, 2003). Achados semelhantes foram previamente reportados por Srinivasan e colegas e, em ambos os estudos, sugere-se que o estresse oxidativo leve à disfunção mitocondrial o que acarreta em apoptose neuronal (SRINIVASAN *et al.*, 2000).

Por fim, no presente estudo avaliou-se a habilidade da PGB e da morfina em

bloquear a hiperalgesia térmica orofacial. Os testes ocorreram nas semanas 4 ou 5 após o tratamento com STZ, tempo em que foi registrado o pico da hiperalgesia ao frio e ao calor.

Nossos dados mostram que a hiperalgesia térmica (ao frio e ao calor) avaliada na região orofacial foi significativamente reduzida pelo tratamento com PGB na dose de 30 mg/Kg, a qual não modificou a responsividade dos animais do grupo controle aos estímulos térmicos, bem como não interferiu na atividade locomotora dos animais. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que avaliaram o tratamento com PGB no mesmo modelo de diabetes, porém utilizando outros estímulos aplicados na pata dos animais. Beyreuther e colaboradores reportaram que a PGB na dose de 10 mg/Kg foi capaz de aumentar o limiar mecânico no teste de pressão da pata de animais diabéticos em relação ao grupo controle 21 dias pós-STZ, enquanto que na dose de 100 mg/Kg foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica no teste da placa quente 10 dias pós-STZ (BEYREUTHER *et al.*, 2006). Outro estudo relatou que a PGB, nas doses de 10 e 30 mg/Kg, reduziu a hiperalgesia mecânica na pata de animais diabéticos na terceira semana após o tratamento com STZ (YAMAMOTO *et al.*, 2009). A PGB também já se mostrou eficaz na redução da hiperalgesia em outros modelos animais de dor neuropática (FIELD *et al.*, 1999; GUSTAFSSON & SANDIN, 2009), bem como tem sido considerada em estudos clínicos, uma das drogas de escolha para o controle da dor neuropática diabética (TESFAYE & SELVARAJAH, 2012).

O mecanismo de ação proposto para o efeito anti-hiperalgésico da PGB é sua capacidade de ligação à subunidade $\alpha 2\delta$ de VGCCs pré-sinápticos (BLOMMEL & BLOMMEL, 2007; GUAY, 2005; KAVOUSSI, 2006). A entrada de íons cálcio via VGCCs permite a fusão de vesículas de neurotransmissores com a membrana celular, favorecendo a liberação dos mesmos na fenda sináptica. Em alguns estados patológicos, como por exemplo, na dor neuropática, em que há lesão neuronal, os neurônios tornam-se hiperexcitados (KAVOUSSI, 2006). Neste caso, há um influxo excessivo de íons cálcio resultando em um aumento considerável na liberação de neurotransmissores excitatórios, incluindo glutamato e substância P (KAVOUSSI, 2006; KUMAR *et al.*, 2010). Uma característica importante é que sua atividade é estado-dependente, ou seja, modula somente a atividade de neurônios hiperexcitados, como ocorre na dor neuropática diabética. Possivelmente por esta razão a latência para a resposta ao estímulo térmico calor do grupo de animais

tratados com STZ foi superior à latência do grupo controle tratado com veículo nos tempos de 3 e 4 h após a administração da PGB.

A ligação da PGB com a subunidade $\alpha 2\delta$ reduz o influxo de íons cálcio por uma alteração na conformação do canal. Isto resulta em uma redução da liberação de neurotransmissores e, conseqüentemente, da estimulação de receptores pós-sinápticos, retornando o neurônio ao seu estado fisiológico normal. Este mecanismo confere à PGB as propriedades ansiolítica, anticonvulsivante e analgésica (KAVOUSSI, 2006). Em adição, estudos recentes mostram que o transporte de subunidades $\alpha 2\delta$ para terminais pré-sinápticos está aumentado na medula espinhal de ratos com neuropatia, o que pode contribuir para o efeito anti-hiperalgésico da PGB (BAUER *et al.*, 2009). Além disso, tem sido demonstrado que a PGB reduz a liberação de SP e de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A liberação periférica destes dois mediadores está envolvida no desenvolvimento de hiperalgisia em modelos de dor neuropática, portanto a inibição da liberação desses neuropeptídeos pela PGB poderia contribuir para seu efeito anti-hiperalgésico (PARK *et al.*, 2010).

Assim como a PGB, o tratamento dos animais com a morfina, na dose de 2,5 mg/Kg, ocasionou a redução da hiperalgisia térmica em animais diabéticos, avaliada 4 ou 5 semanas após a STZ, sem produzir déficit motor. No entanto, o efeito anti-hiperalgésico da morfina somente foi observado 30 min e 1 hora após a sua administração, enquanto que o efeito da PGB foi observado da 1^a até a 6^a hora após os tratamentos. Ainda foi testado o efeito da morfina na dose de 5 mg/Kg sobre a hiperalgisia térmica ao frio na quinta semana após o tratamento com a STZ, apresentando um efeito anti-hiperalgésico de maior duração, porém os animais apresentaram déficit motor (dados não mostrados). Diferentemente da PGB, estudos em animais e em pacientes diabéticos têm mostrado que o efeito analgésico dos opióides é reduzido na dor neuropática diabética (WILLIAMS *et al.*, 2008). Além disso, clinicamente, o uso de opióides em dores crônicas tem sido limitado em função de seus efeitos adversos, que incluem sonolência, constipação, tolerância e potencial para adição (HURLEY *et al.*, 2008).

Em modelos animais de diabetes, vários autores têm descrito redução da eficácia analgésica da morfina. No estudo de Otto e colaboradores, que avaliou hiperalgisia mecânica na pata de ratos diabéticos, foi demonstrado que na semana

22 após a STZ, o efeito anti-hiperalgésico da morfina na dose de 3 mg/Kg não foi diferente daquele produzido na semana 3 com a administração de morfina na dose de 1 mg/Kg, sugerindo a redução progressiva na efetividade do tratamento (OTTO *et al.*, 2011). Corroborando esses dados, Yamamoto *et al.* mostraram que na semana 3 após a STZ a morfina somente na dose de 10 mg/Kg reduziu a hiperalgisia mecânica em ratos diabéticos, efeito não mais observado na semana 7 após a STZ (YAMAMOTO *et al.*, 2009). Adicionalmente, no teste de retirada da cauda, foi descrito um efeito antinociceptivo significativamente menor da morfina em ratos diabéticos em comparação ao grupo controle (GULLAPALLI *et al.*, 2002). Esse conjunto de resultados sugere que o efeito antinociceptivo e/ou anti-hiperalgésico da morfina é reduzido concomitantemente à evolução da doença. Essa observação poderia explicar a efetividade da morfina em reduzir a hiperalgisia térmica no presente estudo, já que a mesma foi avaliada em períodos anteriores àqueles relacionados à falta ou redução do efeito da morfina.

Existem ainda algumas sugestões para os mecanismos subjacentes a essa redução do efeito antinociceptivo da morfina em modelos de dor neuropática diabética. Segundo Otto e colaboradores a hiporresponsividade a agonistas dos receptores μ -opiídeos não parece estar relacionada a alterações na afinidade de ligação com o receptor ou com a densidade do mesmo na medula espinhal, mas parece estar relacionada a alterações na sinalização intracelular deflagrada pela ativação de receptores do tipo μ (OTTO *et al.*, 2011). Nesse sentido, já foi demonstrado que não há diferença na ativação da proteína G após ligação de um agonista μ -opiídeo em ratos controle e tratados com STZ, a despeito da redução do efeito antinociceptivo observado nesse último grupo. Assim, esses dados sugerem que a redução no efeito do agonista é causada por uma disfunção nas vias celulares após a ativação da proteína G (OHSAWA *et al.*, 2000).

Recentemente, outra hipótese foi sugerida para explicar a reduzida efetividade da morfina em ratos diabéticos. Taliyan & Sharma relatam que citocinas pró-inflamatórias contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática. Além disso, citocinas como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) são capazes de interagir com receptores opiídeos e modular sua ação. O baço é considerado uma fonte rica de citocinas e fatores derivados do baço são conhecidos por modular o efeito antinociceptivo da morfina. Sendo assim, a

redução do efeito de analgésicos opióides em ratos diabéticos pode ser devido a um aumento na formação e liberação destes fatores por células mononucleares do baço (TALIYAN & SHARMA, 2012). Além disso, a administração de homogenato de baço, preparado a partir de órgãos de animais diabéticos 30 dias pós-STZ, resultou na indução de hiperalgisia em animais normoglicêmicos. Isto sugere que alguns fatores liberados do baço durante o diabetes contribuem para esta condição (KHAN *et al.*, 2008), a qual ainda precisa ser investigada na hiperalgisia orofacial associada ao diabetes.

6 CONCLUSÃO

A administração de um única dose de STZ (50 mg/Kg) resultou em marcante e persistente alteração da glicemia dos animais, bem como em hiperalgesia orofacial térmica ao calor e ao frio, observada a partir das semanas 1 e 2, respectivamente. As alterações sensoriais orofaciais (hiperalgesia ao frio e calor) persistiram até a quinta semana pós-STZ, período em que se detectou significativa perda neuronal no gânglio do trigêmeo de animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos.

Como pode ser observado no esquema abaixo, o tratamento com PGB na dose de 30 mg/Kg resultou na redução da hiperalgesia térmica (ao frio e ao calor), com efeito anti-hiperalgésico prolongado, enquanto que a menor dose (de 10 mg/Kg) reduziu somente a hiperalgesia ao frio. A morfina também apresentou efeito anti-hiperalgésico para ambos os estímulos, porém com efeito nos tempos de 30 min e 1 hora após a administração.

Tratamentos	Hiperlgesia orofacial			
	Química	Mecânica	Térmica ao calor	Térmica ao frio
STZ 50 mg/Kg i.p.	–	–	+ (Semanas 1 – 5)	+ (Semanas 2 – 5)
PGB 30 mg/Kg v.o.	n.a.	n.a.	↓ (1 – 6 h)	↓ (1 – 6 h)
PGB 10 mg/Kg v.o.	n.a.	n.a.	↔	↓ (4 e 5 h)
Morfina 2,5 mg/Kg s.c.	n.a.	n.a.	↓ (¹ / ₂ e 1 h)	↓ (¹ / ₂ h)

ESQUEMA 1 – DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA OROFACIAL APÓS STZ E INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS

Os símbolos + e – indicam desenvolveu e não desenvolveu, respectivamente. Os símbolos ↓, ↔ e n.a. indicam reduziu, não reduziu e não avaliado, respectivamente. As marcações entre parênteses indicam o tempo.

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que o tratamento com STZ em ratos induz o desenvolvimento de hiperalgesia orofacial térmica ao calor e ao frio, mas não química e mecânica, a qual é mais suscetível à redução pela PGB em comparação à morfina, sugerindo um maior potencial terapêutico desta droga no tratamento da dor neuropática diabética orofacial.

REFERÊNCIAS

- AHLGREN, S.C.; LEVINE, J.D. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats is not sympathetically maintained. **Brain Research**, v. 616, p. 171-5, 1993.
- ALI, S. *et al.* Streptozotocin induced diabetes: mechanisms of induction. **International Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 4, n. 04, p. 11-5, 2012.
- ANDRADE, EL; MEOTTI, FC; CALIXTO, J.B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 133, p. 189-204, 2012.
- ARAP, A. *et al.* Trigeminal pain and quantitative sensory testing in painful peripheral diabetic neuropathy. **Archives of Oral Biology**, v. 55, p. 486-93, 2010.
- ASHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, p. 1160-71, 2012.
- BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940-50, 2008.
- BARRETT, A.M. *et al.* Epidemiology, public health burden, and treatment of diabetic peripheral neuropathic pain: a review. **Pain Medicine**, v. 8, n. S2, p. S50-62, 2007.
- BARRIÈRE, D.A. *et al.* Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization. **Pain**, v. 153, p. 553-61, 2012.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, p. 1-12, 2012.
- BAUER, C.S. *et al.* The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha2delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha2delta ligand pregabalin. **The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 13, p. 4076-88, 2009.
- BENOLIEL, R.; ELIAV, E. Neuropathic orofacial pain. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, p. 237-54, 2008.
- BEYREUTHER, B.; CALLIZOT, N.; STÖHR, T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model for painful diabetic neuropathy. **European Journal of Pharmacology**, v. 539, p. 64-70, 2006.
- BISHNOI, M. *et al.* Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. **Molecular Pain**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2011.
- BLOMMEL, M.L.; BLOMMEL, A.L. Pregabalin: an antiepileptic agent useful for neuropathic pain. **American Journal of Health-system Pharmacy**, v. 64, p. 1475-82, 2007.
- BORTOLETTO, M. **Risco de ulceração em pés de portadores de diabetes mellitus em Londrina, Paraná: Caracterização do cuidado na atenção básica, prevalência e fatores**

associados. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

BUREN, J.J. VAN *et al.* Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. **Molecular Pain**, v. 1, n. 17, p. 1-11, 2005.

CADET, R. *et al.* Is there a correlation between scores of nociceptive behavioral responses to formalin injections given at different body sites in the rat? **Neuroscience Letters**, v. 242, p. 123-6, 1998.

CALCUTT, N.A.; CHAPLAN, S.R. Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 1478-82, 1997.

CARDENAS VMA. **Identificação dos ativos e o efeito das frações hidroalcoólica e acetato de etila de folhas de *Smallanthus sanchifolius* (yacón) sobre parâmetros bioquímicos em ratos Wistar normais e com diabetes induzido por estreptozocina.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CASPANI, O. *et al.* The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. **PloSone**, v. 4, n. 10, p. e7383, 2009.

CAVAGNOLLI, G. **Hemoglobina Glicada (A1C) no Diagnóstico do Diabetes Mellitus.** Dissertação (Mestrado em Endocrinologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CHEN, S.; PAN, H. Hypersensitivity of Spinothalamic Tract Neurons Associated With Diabetic Neuropathic Pain in Rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 10, p. 2726-33, 2002.

CHEN, X.; LEVINE, J.D. Hyper-responsivity in a subset of C-fiber nociceptors in a model of painful diabetic neuropathy in the rat. **Neuroscience**, v. 102, n. 1, p. 185-92, 2001.

CHICHORRO, J.G. *et al.* Endothelin ETB Receptor Antagonist Reduces Mechanical Allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Experimental Biology and Medicine**, p. 1136-40, 2006 [a].

CHICHORRO, J.G. *et al.* Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pain**, v. 123, p. 64-74, 2006 [b].

CHICHORRO, J.G. *et al.* Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 1175-84, 2006 [c].

CHICHORRO, J.G. *et al.* Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**, v. 43, p. 133-42, 2009.

CHIOCA, L.R. *et al.* Subchronic fluoride intake induces impairment in habituation and active avoidance tasks in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, p. 196-201, 2008.

CHRISTENSEN, D. *et al.* Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Pain**, v. 83, p. 433-40, 1999.

CHRISTOPH, T.; VRY, J. DE; TZSCHENTKE, T.M. Tapentadol, but not morphine, selectively inhibits disease-related thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 470, p. 91-4, 2010.

CLAVELOU, P. *et al.* Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 103, p. 349-53, 1989.

CLAVELOU, P. *et al.* The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, v. 62, p. 295-301, 1995.

COLE, B.E. Diabetic peripheral neuropathic pain: recognition and management. **Pain Medicine**, v. 8, n. S2, p. S27-32, 2007.

COURTEIX, C.; ESCHALIER, A; LAVARENNE, J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. **Pain**, v. 53, p. 81-8, 1993.

CUNHA, J.M. *et al.* Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 2, p. 197-206, 2009.

DAVIES, A.J.; KIM, Y.H.; OH, S.B. Painful Neuron-Microglia Interactions in the Trigeminal Sensory System. **The Open Pain Journal**, v. 3, p. 14-28, 2010.

DELFINO, V.D.A. *et al.* Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina : comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-6, 2002.

DICK, I.E. *et al.* Sodium channel blockade may contribute to the analgesic efficacy of antidepressants. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 4, p. 315-24, 2007.

DOBRETSOV, M. *et al.* Mechanical hyperalgesia in rat models of systemic and local hyperglycemia. **Brain Research**, v. 960, p. 174-83, 2003.

DORIA, A. Genetics of diabetes complications. **Current Diabetes Reports**, v. 10, n. 6, p. 467-75, 2010.

DUBNER, R.; BENNETT, G.J Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience**, v. 6, p. 381-418, 1983.

FIELD, M.J. *et al.* Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurones? **Pain**, v. 83, p. 303-11, 1999.

FOX, A. *et al.* Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. **Pain**, v. 81, p. 307-16, 1999.

FRANCIOSI, M. *et al.* Costs of treatment and complications of adult type 1 diabetes. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, p. 6-11, 2012.

FRIED, K. *et al.* Nerve Injury-Induced Pain in the Trigeminal System. **The Neuroscientist**, v. 7, n. 2, p. 155-65, 2001.

FUCHS, D. *et al.* Sensitized peripheral nociception in experimental diabetes of the rat. **Pain**, v. 151, p. 496-505, 2010.

GARCÍA-AÑOVEROS, J.; NAGATA, K. TRPA1. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 179, p. 347-62, 2007.

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

GUAY, D.R.P. Pregabalin in Neuropathic Pain : A More “ Pharmaceutically Elegant ” Gabapentin ? **The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy**, v. 3, n. 4, p. 274-87, 2005.

GULLAPALLI, S. *et al.* Role of L-type Ca²⁺ channels in attenuated morphine antinociception in streptozotocin-diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 435, p. 187-94, 2002.

GUSTAFSSON, H.; SANDIN, J. Oral pregabalin reverses cold allodynia in two distinct models of peripheral neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 605, p. 103-8, 2009.

GUTIERRES, V. **Avaliação dos efeitos fisiológicos e bioquímicos do tratamento com curcumina incorporada ao iogurte no diabetes experimental**. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

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

HINDER, L.M. *et al.* Bioenergetics in diabetic neuropathy: what we need to know. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 17, p. 10-4, 2012.

HURLEY, R.W. *et al.* Pregabalin as a treatment for painful diabetic peripheral neuropathy: a meta-analysis. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 33, n. 5, p. 389-94, 2008.

IKEDA, T. *et al.* Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. **Neuroscience Research**, v. 63, p. 42-6, 2009.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes Atlas**. Disponível em: < <http://www.idf.org/diabetesatlas> >. Acesso em 02/07/2012.

INZUCCHI, S.E. Diagnosis of Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 367, p. 542-50, 2012.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-10, 2001.

JUNOD, A. *et al.* Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. 2129-39, 1969.

KALICHMAN, M.W. *et al.* Nerve conduction velocity, laser Doppler flow, and axonal caliber in galactose and streptozotocin diabetes. **Brain Research**, v. 810, p. 130-7, 1998.

KAMEI, J. *et al.* Role of vanilloid VR1 receptor in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 422, p. 83-6, 2001.

KAVOUSSI, R. Pregabalin: From molecule to medicine. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16 Suppl 2, p. S128-33, 2006.

KHAN, N.; SINGH, N.; JAGGI, A.S. Possible role of spleen-derived factors, vanilloid receptors and calcitonin gene-related peptide in diabetes induced hyperalgesia in mice. **Yakugaku zasshi - Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 128, n. 11, p. 1699-705, 2008.

KILPATRICK, E.S. Arguments for and against the role of glucose variability in the development of diabetes complications. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 649-55, 2009.

KISHI, M. *et al.* Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 51, p. 819-24, 2002.

KUMAR, N. *et al.* Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, p. 552-61, 2010.

LAZAROV, N.E. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 19-59, 2002.

LYNCH, J.J.; JARVIS, M.F.; KOWALUK, E.A. An adenosine kinase inhibitor attenuates tactile allodynia in a rat model of diabetic neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 364, p. 141-6, 1999.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N.G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, p. 457-62, 1996.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. **Métodos Quantitativos em Morfologia**. Rio de Janeiro: UERJ, 1995.

MCNAMARA, C.R. *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 33, p. 13525-30, 2007.

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

NICKANDER, K.K. *et al.* Effect of alfa-tocopherol deficiency on indices of oxidative stress in normal and diabetic peripheral nerve. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 126, p. 6-14, 1994.

OBROSOVA, I.G. Diabetic Painful and Insensate Neuropathy : Pathogenesis and Potential Treatments. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 6, p. 638-47, 2009.

- OHSAWA, M. *et al.* Effects of a mu-opioid receptor agonist on G-protein activation in streptozotocin-induced diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 401, p. 55-8, 2000.
- OHSAWA, M. *et al.* RhoA/Rho kinase pathway contributes to the pathogenesis of thermal hyperalgesia in diabetic mice. **Pain**, v. 152, p. 114-22, 2011.
- OTTO, K.J. *et al.* Longitudinal study of painful diabetic neuropathy in the Zucker diabetic fatty rat model of type 2 diabetes: impaired basal G-protein activity appears to underpin marked morphine hyposensitivity at 6 months. **Pain Medicine**, v. 12, p. 437-50, 2011.
- PABBIDI, R.M. *et al.* Direct Role of Streptozotocin in Inducing Thermal Hyperalgesia by Enhanced Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Sensory Neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 995-1004, 2008 [a].
- PABBIDI, R.M. *et al.* Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity. **Molecular Pain**, v. 4, n. 9, p. 1-17, 2008 [b].
- PABREJA, K. *et al.* Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 661, p. 15-21, 2011.
- PARK, H.J. *et al.* Attenuation of neuropathy-induced allodynia following intraplantar injection of pregabalin. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 57, p. 664-71, 2010.
- PEREIRINHA, C. **Influência da Diabetes Mellitus no processo da osteointegração.** Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.
- RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 219-26, 2004.
- RAHIM-WILLIAMS, B. *et al.* Influences of adult-onset diabetes on orofacial pain and related health behaviors. **Journal of Public Health Dentistry**, v. 70, p. 85-92, 2010.
- RAMOS, K.M. *et al.* Pathogenesis of Spinally Mediated Hyperalgesia in Diabetes. **Diabetes**, v. 56, p. 1569-76, 2007.
- REUSSER, F. Mode of Action of Streptozotocin. **Journal of Bacteriology**, v. 105, n. 2, p. 580-8, 1971.
- RIBEIRO, S.; SCHMIDT, A.P.; SCHMIDT, S.R.G. O uso de opióides no tratamento da dor crônica não oncológica: O papel da metadona. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 5, p. 644-51, 2002.
- RODELLA, L. *et al.* Nitric oxide involvement in the trigeminal hyperalgesia in diabetic rats. **Brain Research**, v. 865, p. 112-5, 2000.
- ROSA, R. **Diabetes mellitus: magnitude das hospitalizações na rede pública do Brasil, 1999-2001.** Tese (Doutorado em Epidemiologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- SAID, G. Diabetic neuropathy - a review. **Nature Clinical Practice**, v. 3, n. 6, p. 331-40, 2007.

- SALGADO, P. **Prevalência e fatores associados à nefropatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- SANGO, K. *et al.* Diabetes is not a potent inducer of neuronal cell death in mouse sensory ganglia, but it enhances neurite regeneration in vitro. **Life Sciences**, v. 71, p. 2351-68, 2002.
- SCHMEICHEL, A.M.; SCHMELZER, J.D.; LOW, P.A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 52, p. 165-71, 2003.
- SCHMIDT, M.I. *et al.* Prevalência de diabetes e hipertensão no Brasil baseada em inquérito de morbidade auto-referida, Brasil, 2006. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, supl. 2, p. 74-82, 2009.
- SCHREIBER, A.K. *et al.* Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1286-97, 2012.
- SELVARAJAH, D. *et al.* Central nervous system involvement in diabetic neuropathy. **Current Diabetes Reports**, v. 11, p. 310-22, 2011.
- SESSLE, B.J. Acute and Chronic Craniofacial Pain: Brainstem Mechanisms of Nociceptive Transmission and Neuroplasticity, and their Clinical Correlates. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 57-91, 2000.
- SESSLE, B.J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anestesiologica**, v. 71, n. 4, p. 117-36, 2005.
- SESSLE, B.J. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 33, p. 243-61, 2006.
- SHAW, J.E.; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, p. 4-14, 2010.
- SILVA, F.C. *et al.* Prevenção da Dor Fantasma com Uso de Cloridrato de Amitriptilina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 4, p. 345-9, 2008.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.** São Paulo: AC Farmacêutica. , 2009
- SRINIVASAN, S.; STEVENS, M.; WILEY, J.W. Diabetic Peripheral Neuropathy. **Diabetes**, v. 49, p. 1932-8, 2000.
- STOLAR, M. Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Medicine**, v. 123, n. 3A, p. S3-11, 2010.
- SUGIMOTO, K.; MURAKAWA, Y.; SIMA, A.A.F. Diabetic neuropathy - a continuing enigma. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 16, p. 408-33, 2000.
- SUN, W.; MIAO, B.; WANG, X. *et al.* Gastrodin inhibits allodynia and hyperalgesia in painful diabetic neuropathy rats by decreasing excitability of nociceptive primary sensory neurons. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. e39647, 2012.

- SUZUKI, Y. *et al.* Antinociceptive mechanism of gosha-jinki-gan in streptozotocin-induced diabetic animals: role of nitric oxide in the periphery. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 79, p. 387-91, 1999.
- TABARELLI, Z. *et al.* Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1531-40, 2004.
- TALIYAN, R.; SHARMA, P.L. Possible mechanism of protective effect of thalidomide in STZ-induced-neuropathic pain behavior in rats. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 89-97, 2012.
- TAVARES, B.C. *et al.* Resiliência de pessoas com diabetes mellitus. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 20, n. 4, p. 751-7, 2011.
- TESFAYE, S. *et al.* Painful diabetic peripheral neuropathy : consensus recommendations on diagnosis , assessment and management. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 27, p. 629-38, 2011.
- TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 28, supl. 1, p. 8-14, 2012.
- THALAKOTI, S. *et al.* Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology. **Headache**, v. 47, n. 7, p. 1008-25, 2007.
- THULESEN, J. *et al.* Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 62-8, 1997.
- TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J. Thermosensation and pain. **Journal of Neurobiology**, v. 61, p. 3-12, 2004.
- TROGER, J. *et al.* The effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on substance P and calcitonin gene-related peptide expression in the rat trigeminal ganglion. **Brain Research**, v. 842, p. 84-91, 1999.
- VIEGAS-PEREIRA, A. **Aspectos sócio-demográficos e de saúde dos idosos com diabetes auto-referido: um estudo para o estado de Minas Gerais, 2003**. Tese (Doutorado em Demografia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- WAITE, P.; ASHWELL, K. Trigeminal Sensory System. **The Human Nervous System**. p. 1093-124, USA: Elsevier, 2004.
- WEI, H. *et al.* Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. **Anesthesiology**, v. 111, n. 1, p. 147-54, 2009.
- WEI, H. *et al.* Roles of cutaneous versus spinal TRPA1 channels in mechanical hypersensitivity in the diabetic or mustard oil-treated non-diabetic rat. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 578-84, 2010.
- WILLIAMS, J. *et al.* Decreased basal endogenous opioid levels in diabetic rodents: effects on morphine and delta-9-tetrahydrocannabinoid-induced antinociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 584, p. 78-86, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics - Diabetes**. Disponível em: <
http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/> Acesso em: 02/07/2012.

YAGIHASHI, S.; YAMAGISHI, S.; WADA, R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77S, p. S184-9, 2007.

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

ZHANG, X.; HUANG, J.; MCNAUGHTON, P.A. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 24, p. 4211-23, 2005.

ZOCHODNE, D.W. *et al.* Does diabetes target ganglion neurones? Progressive sensory neurone involvement in long-term experimental diabetes. **Brain**, v. 124, p. 2319-34, 2001.