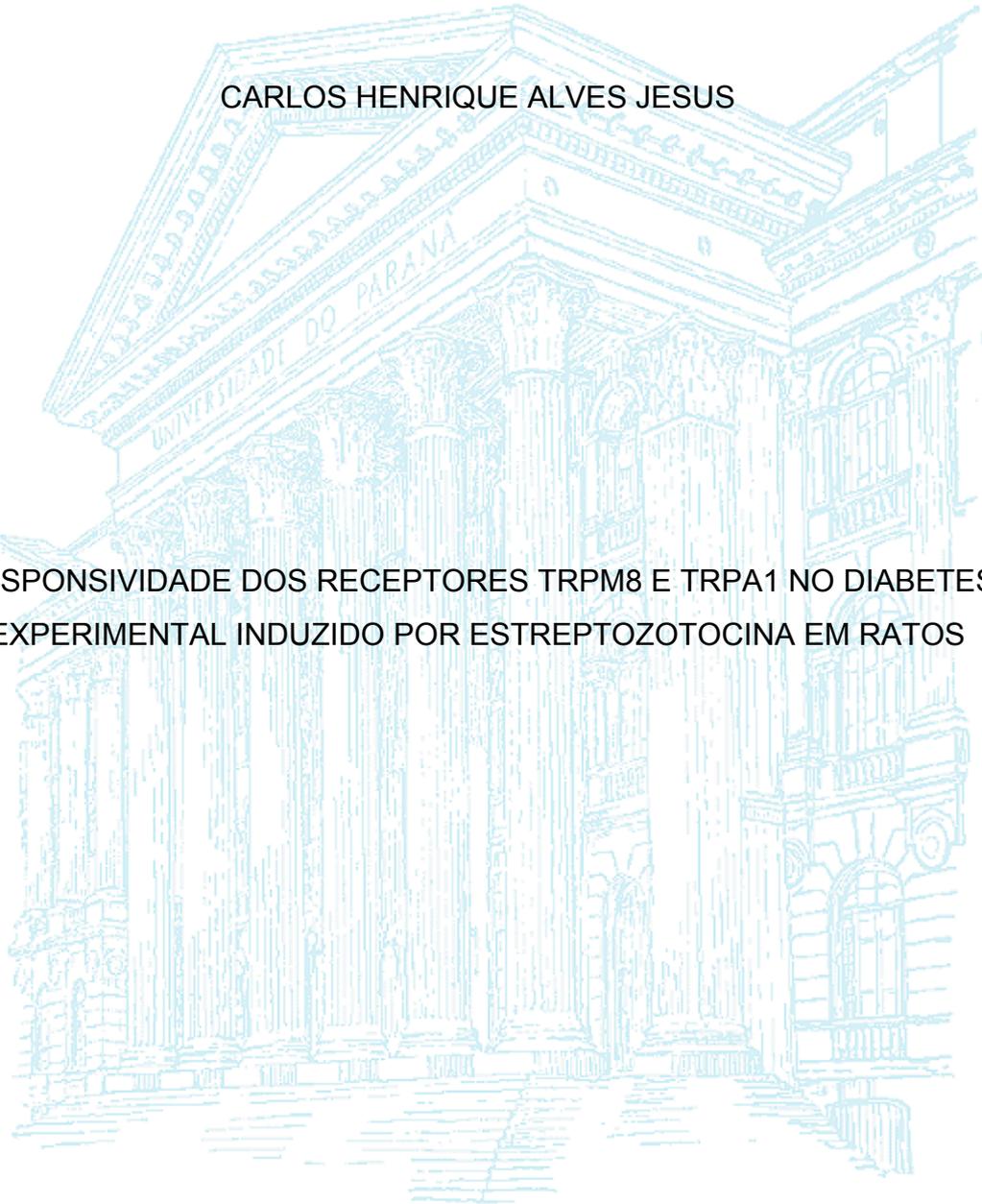


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS HENRIQUE ALVES JESUS

RESPONSIVIDADE DOS RECEPTORES TRPM8 E TRPA1 NO DIABETES  
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS



CURITIBA  
2015

RESPONSIVIDADE DOS RECEPTORES TRPM8 E TRPA1 NO DIABETES  
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS

CARLOS HENRIQUE ALVES JESUS

RESPONSIVIDADE DOS RECEPTORES TRPM8 E TRPA1 NO DIABETES  
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS

Trabalho apresentado como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas do Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Joice Maria da Cunha

CURITIBA

2015

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o amor, carinho e dedicação durante todos os 5 anos de graduação e por toda a minha vida. Obrigado por compreenderem minhas escolhas profissionais, por entenderem que mesmo sem receber uma bolsa de auxílio apropriada, sem poder realmente ajudar em casa, eu estava fazendo o que eu gosto, com amor e dedicação, assim como eles mesmo me ensinaram. Obrigado à minha mãe, que fez de tudo, desde esperar em uma fila de madrugada pra conseguir vaga na pré-escola de um colégio público, sempre ou quase sempre me esperar acordada em casa até eu voltar tarde da faculdade, aguardar minha volta pra casa depois de 14 meses fora do país e muitas outras coisas. Obrigado ao meu pai, por me ensinar respeito e paciência mesmo que as condições sejam desfavoráveis, por me ensinar a ser gentil com todos, mesmo que eu não seja tratado da mesma forma. Sem o apoio destes pais eu não teria sonhado com metade do que já conquistei. Obrigado também a pequena Laura, por ser uma irmã sempre muito carinhosa, por ter-me como exemplo e me amar não importa como eu seja.

À minha orientadora, professora e amiga Joice Maria da Cunha, por me convidar a visitar o laboratório de Farmacologia da Dor, por me aceitar como parte do time, por ter tido confiança suficiente ao me delegar este projeto e muitas outras funções, e por me inspirar a ser um ótimo pesquisador mesmo que as condições não sejam as mais favoráveis. Por me carregar pra congressos, por me apresentar aos seus colegas e por me ajudar na minha primeira experiência fora do país.

Ao melhor amigo e parceiro Savin, por ser paciente e incrível, por me aceitar e amar do jeito que eu sou e por querer estar ao meu lado não importa o quão grande o mundo seja.

Às amigas Karine, Juliana, Jeniffer, Helyandra e Jessica, pelo companheirismo e divertimento durante esses anos, pelas fofocas e desabafos. Obrigado por serem tão amáveis.

À amiga Carina pelo incrível apoio, risadas, conselhos e “hard work” de sempre. Obrigado por me apoiar, me ajudar a ser organizado, me estimular e me oferecer um pedacinho do seu lanche quando tínhamos experimentos juntos.

Às amigas e colaboradoras Anne e Franciele por toda a ajuda disponibilizada durante o desenvolvimento do projeto.

À professora Juliana por dividir o espaço dos laboratórios, por ser tão gentil e me ajudar com cartas de recomendação, por também ser uma grande inspiração profissional, e por ajudar a Joice a comandar uma equipe maravilhosa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

## RESUMO

Estima-se que mais da metade dos portadores de diabetes desenvolvem polineuropatia difusa, a qual é acompanhada de anormalidades em várias funções autonômicas, redução na velocidade de condução nervosa sensorial e motora e alterações na percepção sensorial a estímulos vibratórios, mecânicos e térmicos. Nesse sentido, é descrito que a alodinia ao frio seja uma das queixas mais comuns dos diabéticos e que a percepção das anormalidades nos limiares de resposta a estímulos térmicos de frio é um teste sensível para a detecção da polineuropatia diabética em fibras de pequeno calibre, a qual precede patologicamente os traumas e a formação de úlceras nos pés dos portadores de diabetes. Apesar da importância desse sintoma clínico, pouco tem sido explorado acerca dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da alodinia ao frio no diabetes. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar as alterações na percepção ao frio (hiperalgesia, hipoalgesia ou alodinia) no diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina (STZ), correlacionando-as com o estabelecimento da alodinia mecânica e o envolvimento dos receptores TRPM8 e TRPA1. Foi observado que ratos diabéticos não mostraram desenvolvimento de alodinia ao frio quando comparados aos ratos normoglicêmicos. No entanto, a alodinia mecânica desenvolveu-se a partir da 2ª semana até a 4ª semana de avaliação, fenômeno este significativamente reduzido pela administração do antagonista de receptores TRPA1 (HC030031, 300 µg/pata). Animais diabéticos mostraram redução no número de *flinches* induzidos pela injeção intraplantar de óleo de mostarda (agonista TRPA1; dose de 0,1%/50 µL), ou pela injeção intraplantar de mentol (agonista TRPM8; doses de 0,5% e 1%/50 µL), quando comparados aos respectivos grupos controle normoglicêmico de cada dose. A administração intraplantar de óleo de mostarda alterou o limiar mecânico tanto em animais normoglicêmicos quanto em animais diabéticos. Em conjunto, estes resultados sugerem que o diabetes experimental altera a responsividade dos receptores TRPA1 e TRPM8 e que o receptor TRPA1 parece ter uma importante função na resposta mecânica associada à dor neuropática diabética.

Palavras-chave: diabetes, dor neuropática, alodinia ao frio, TRPA1, TRPM8.

## ABSTRACT

It is estimated that more than half of diabetic patients develop diffused polyneuropathy, which is followed by abnormalities in several autonomic functions, reduction of motor and sensory nerve conduction velocity and changes in sensory perception of vibration, mechanical and thermal stimulus. In this sense, it is described that cold allodynia is one of the most common complaints of diabetics and the most sensitive test for earlier detection of diabetic polyneuropathy in low caliber fibers, which pathologically precedes the injuries and formation of ulcers on the feet of diabetic patients. Although the importance of this clinical symptom, little has been explored about the mechanisms involved in the cold allodynia establishment in diabetes. Therefore, the goal of the current study was investigated changes in cold perception (hyperalgesia, hypoalgesia or allodynia) observed in experimental diabetes, which was chemically induced by streptozotocin (STZ), correlating them to mechanical allodynia and the involvement of TRPM8 and TRPA1 receptors. It was observed that diabetic rats did not show a development of cold allodynia, when compared to normoglycemic rats. However, mechanical allodynia was significantly developed from the 2<sup>nd</sup> to the 4<sup>th</sup> week of evaluation, such a phenomenon was significantly reduced by the topical administration of a TRPA1 receptor antagonist (HC030031, 40µl, 300µg/paw doses). Diabetic animals showed a reduction in the number of *flinches* induced by the intraplantar injection of mustard oil (TRPA1 agonist; 0.1%/50 µl doses), or intraplantar injection of menthol (TRPM8 agonist; 0.5% and 1%/50µl doses) when compared to their normoglycemic control groups. The intraplantar injection of mustard oil significantly reduced the withdrawal mechanical threshold in both normoglycemic and diabetic rats. Together, these data suggest that experimental diabetes alters the responsiveness of TRPA1 and TRPM8 receptors and that TRPA1 receptor seems to have an important role in mechanical response associated with diabetic neuropathy pain.

Keywords: diabetes, neuropathic pain, cold allodynia, TRPA1, TRPM8.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	7
1.1 DIABETES .....	7
1.2 NEUROPATIA E DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA .....	8
1.3 TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA .....	10
1.4 TERMOSENSAÇÃO E TRANSDUÇÃO DOS SINAIS TÉRMICOS .....	11
2. OBJETIVOS .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1 ANIMAIS .....	15
3.2 INDUÇÃO DO DIABETES .....	15
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	15
3.3.1 ESTIMULAÇÃO TÉRMICA POR FRIO .....	15
3.3.2 ESTIMULAÇÃO MECÂNICA .....	16
3.3.3 ESTIMULAÇÃO QUÍMICA .....	16
3.3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR TRPA1 SOBRE O LIMAR MECÂNICO DE ANIMAIS DIABÉTICOS.....	17
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 DECURSO TEMPORAL DE RESPOSTA AO ESTÍMULO TÉRMICO DE FRIO E AO ESTÍMULO MECÂNICO .....	18
4.2 RESPOSTA NOCICEPTIVA AO AGONISTA DO RECEPTOR TRPA1 .....	19
4.3 RESPOSTA NOCICEPTIVA AO AGONISTA DO RECEPTOR TRPM8.....	20
4.4 ALTERAÇÃO NO LIMAR MECÂNICO FRENTE AO AGONISTA E ANTAGONISTA TRPA1 .....	21
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÕES.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DIABETES

“O diabetes mata sem velocidade ou precisão, mas com discrição e uma lenta acumulação de insultos. Pode roubar de uma pessoa as habilidades de ver, sentir, pensar, andar e praticar sexo”. Essa é a descrição usada no relatório de planos para o diabetes feito pelo Instituto Nacional Americano de Saúde em 2011. Em todo mundo, aproximadamente 415 milhões de pessoas são diabéticas e a previsão é de que em 2040 esse número alcance 642 milhões. Em 2015 o diabetes já matou cerca de 5 milhões de pessoas em todos mundo e o crescimento acelerado do número de pacientes diabéticos pode leva-lo a ser a sétima maior causa de morte no mundo em 2030 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, AMERICAN NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH).

O diabetes é uma doença de altos custos nos sistemas de saúde. O novo atlas do diabetes emitido pela Federação Internacional do Diabetes indica que 12% do total de gastos com saúde no mundo é destinado ao tratamento do diabetes. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION; BROWN & MCBRIDE, 2015). O diabetes é uma doença crônica, causada por deficiência ou falta de produção do hormônio insulina e caracterizada por hiperglicemia e pode ser classificado em dois tipos: o tipo 1 é descrito como dependente de insulina, quando não ocorre nenhuma produção desse hormônio, e é também considerado uma doença autoimune. Relacionado à obesidade e inatividade física, o diabetes tipo 2 é considerado independente de insulina e caracterizado por um dano progressivo na secreção de insulina, disfunção nas células beta do pâncreas e também ausência de sintomas. Um terceiro tipo de diabetes também é registrado, o diabetes gestacional, é assim chamado por afetar mulheres grávidas e ser caracterizado por um aumento nos níveis de glicose sanguínea e baixa tolerância a glicose durante a gestação, e quando não controlado pode causar diabetes tardio tanto na mãe quanto no bebê (HALEY & RICHARDS, 2014; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION).

Alguns sintomas são importantes na caracterização do diabetes, como por exemplo, frequência urinária e sede aumentadas, perda de peso, cansaço e visão turva. Além dos sintomas o diabetes ainda apresenta uma série de complicações, como doenças cardiovasculares, retinopatia e neuropatia, uma complicação comum em pacientes diabéticos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION; SUGIMOTO *et al.*, 2000).

## 1.2. NEUROPATIA E DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define neuropatia como uma disfunção funcional em um ou mais nervos. Há evidências de que a neuropatia represente uma das complicações mais comuns, severas e debilitantes em pacientes diabéticos. Sua prevalência é influenciada por diferentes critérios como o diagnóstico utilizado na clínica, onde testes sensoriais são feitos, e a duração do diabetes. Dentre os aproximadamente 415 milhões de pacientes diabéticos no mundo, de 50% a 70% apresentam neuropatia (CHARNOGURSKI, 2014; LEE-KUBLI *et al.*, 2014; ASLAM *et al.*, 2014). No entanto, a maioria dos pacientes diabéticos podem desenvolver alterações eletrofisiológicas significativas, como redução na velocidade de condução nervosa motora e sensorial, um fator a ser considerado, pois essas alterações trazem efeitos negativos que afetam de forma importante a qualidade de vida dos pacientes levando a incapacidade dos mesmos (SOUZA *et al.*, 2010). Dados da Federação Internacional do Diabetes indicam que no Brasil cerca de 14,3 milhões de pessoas sejam diabéticas, colocando o país em 4º lugar atrás de China, Índia e Estados Unidos. Além disso, considera-se que a mesma porcentagem de pacientes diabéticos no Brasil sejam afetados pela neuropatia (OLIVEIRA *et al.*, 2009; PICON, 2011).

A neuropatia diabética pode ser classificada como neuropatia sensorial aguda, que se manifesta durante ausência de controle glicêmico, e a polineuropatia crônica distal simétrica, a mais comum, e que afeta cerca de 80% dos pacientes diabéticos com neuropatia. A polineuropatia distal simétrica inicialmente afeta os dedos e partes distais dos pés e com o passar do tempo os membros inferiores por completo, bem como as mãos (BOULTON *et al.*, 2005; SAID, 2007; SCHREIBER *et al.*, 2015).

Disfunções em células da glia, danos nos elementos vasculares, tecido conjuntivo, desmielinização e perda de fibras do sistema nervoso periférico são as principais alterações associadas a neuropatia diabética (DIAS & CARNEIRO, 2000), e devido a esses danos um paciente com neuropatia pode apresentar sintomas negativos e positivos (MOREIRA *et al.*, 2005). Dentre os sintomas negativos, dos quais os pacientes não se queixam com frequência, os mais importantes são a perda de sensibilidade ao frio, calor, vibração e dor e ulceração. Sintomas positivos, os quais geram muita preocupação nos pacientes, consistem em queimação, choque e a dor, um dos sintomas mais comuns (SUGIMOTO *et al.*, 2000; TESFAYE & SELVARAJAH, 2012).

A dor neuropática diabética, que afeta cerca de 34% da população diabética (LEE-KUBLI *et al.*, 2014), é decorrente do dano ao sistema nervoso periférico e/ou central e caracteriza-se por alterações na percepção sensorial a estímulos de diferentes naturezas (i.e. mecânicos, térmicos e/ou químicos), manifestando-se como dor espontânea (i.e. dor na ausência de qualquer estimulação), hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nocivos) e/ou alodinia (dor em resposta a estímulos normalmente inócuos). A alodinia se torna debilitante quando estímulos periféricos diários como o encostar dos pés aos lençóis ou meias ou ainda estímulos térmicos de frio não-nocivo passam a ser interpretados como dolorosos. Paradoxalmente, há relatos de déficit na função sensitiva discriminativa de percepção térmica de frio/calor e hipoalgesia. No entanto, por ser raramente reconhecido pelos pacientes, esse déficit leva às lesões traumáticas repetitivas características do chamado “pé diabético”, uma conhecida definição usada para descrever a causa de potenciais amputações em pacientes diabéticos.

A alodinia ao frio, como relatado acima, é um sintoma frequente em pacientes portadores de dor neuropática (JENSEN *et al.*, 2001; WAHREN & TOREBJORK, 1992, YIN *et al.*, 2015). Esse sintoma, também observado em modelos animais de dor neuropática diabética (ZIMMERMAN, 2001; ANDERSSON *et al.*, 2015), manifesta-se como dor, descrita em diferentes termos (i.e. formigamento, pontadas, queimações, coceiras ou dor profunda), e desconforto a temperaturas percebidas normalmente como frescor. De forma muito importante, é apontado que a avaliação do limiar de percepção ao frio nos membros distais parece ser um teste sensível para a detecção de polineuropatia diabética em fibras de pequeno calibre, a qual precede patologicamente os traumas e a formação de úlceras nos pés dos portadores de diabetes (NAVARRO & KENNEDY, 1991; CLAUS *et al.*, 1987, CHANTELAU, 2015). É importante ressaltar que especificamente os estímulos frios (nocivos ou inócuos) parecem ser evocados primariamente como respostas anormais em pacientes diabéticos quando comparado a estímulos de calor (ZIEGLER *et al.*, 1988; OBROSOVA, 2009). Nesse sentido, as anormalidades na sensibilidade térmica são mais frequentes do que alterações na condução nervosa motora ou sensorial. É também importante ressaltar que tais alterações sensoriais estão correlacionadas com o tempo de duração do diabetes, embora sejam observadas em todos os estágios da doença (NAVARRO & KENNEDY, 1991; CHARNOGURSKI, 2014).

Apesar da importância clínica da alodinia ao frio, pouco se conhece a cerca dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no seu estabelecimento e persistência no diabetes. Considerando-se a dor neuropática, alguns mecanismos, no entanto, são apontados como

consensuais, como as alterações em vias metabólicas resultantes da hiperglicemia. A hiperglicemia não é, no entanto, o único fator iniciador responsável pela neuropatia, uma vez que a mesma não é prevenida por um controle rigoroso dos níveis séricos de glicose (CALCUTT *et al.*, 1996; BERTELSMANN *et al.*, 1987; LEE & MCCARTY, 1990, 1992; CUNHA *et al.*, 2009). Dessa maneira, mecanismos como o aumento da glicosilação não-enzimática, hiperatividade da via poliol, alterações microvasculares, ativação microglial, *up-regulation* de receptores específicos, redução no suporte neurotrófico e principalmente, o aumento do estresse oxidativo vêm sendo associados ao desenvolvimento e manutenção do quadro neuropático doloroso no diabetes (SAID, 2007; VINCENT *et al.*, 2004; SCHREIBER *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo tem mostrado extrema importância em mudanças na atividade de compostos biológicos e processos celulares que estão relacionados a complicações patológicas (BOYER, 2015). O estresse oxidativo é gerado quando a produção de radicais livres excede a capacidade antioxidante endógena. A produção elevada de radicais livres provoca mudanças químicas estáveis em macromoléculas essenciais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, comprometendo a função das mesmas, e aumentando a taxa de apoptose (GREENE *et al.*, 1999). A magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada indiretamente pela quantificação de subprodutos estáveis derivados da ação desses radicais sobre lipídios, como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HAE) (PAZDRO AND BURGESS, 2010). Em estudos prévios, observou-se que os níveis de MDA e HAE já se encontram significativamente elevados em nervos ciáticos de ratos após uma semana da indução do diabetes experimental, permanecendo em níveis elevados por pelo menos 12 semanas (CUNHA *et al.*, 2007). Adicionalmente aos nervos periféricos, o aumento do estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia tem sido descrito também em gânglio da raiz dorsal e em gânglios do tronco simpático (OBROSOVA, 2002) e em cérebro de ratos (dados ainda não publicados) tratados com estreptozotocina (STZ), um antibiótico derivado da bactéria gram-positiva *Streptomyces achromogenes*, particularmente tóxico às células beta pancreáticas (JUNOD *et al.*, 1967).

### 1.3. TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

O tratamento com antiepiléticos como a gabapentina e a pregabalina, os mais indicados para esse tipo de condição, tem sido o tratamento de escolha, mostrando eficácia (PELTIER *et al.*, 2014; TEFAYE *et al.*, 2013), porém não equivalente à eficácia dos antidepressivos como a duloxetina (KALSO *et al.*, 2013, PERGOLIZZI *et al.*, 2013).

Como a patogênese da neuropatia diabética é multifatorial, o tratamento da dor neuropática diabética inclui drogas pertencentes a diferentes classes incluindo antidepressivos, antiepiléticos tricíclicos e analgésicos opióides (ANDERSSON *et al.*, 2015). Os analgésicos opióides são comumente indicados, apesar da dor neuropática diabética ser particularmente refratária ao tratamento com medicamentos desta classe, acarretando na prescrição de doses tão altas que os efeitos colaterais como constipação, sedação e dependência passam a ser intoleráveis pelos pacientes (KING *et al.*, 2015, TESFAYE *et al.*, 2012). O tratamento com antidepressivos tricíclicos é também frequentemente indicado e oferece alívio da dor que excede minimamente ao efeito induzido pelo tratamento placebo, porém é limitado também pelos efeitos colaterais indesejados (KALSO *et al.*, 2013). Estudos indicam que mesmo após essas abordagens terapêuticas, somente um terço dos pacientes com dor neuropática diabética obtém alívio da dor superior a 50% (JAVED *et al.*, 2015), permanecendo assim um desafio para os profissionais da saúde. A inexistência de drogas realmente efetivas para a terapia da dor neuropática diabética pode ser decorrente da complexidade envolvida na fisiopatologia do diabetes. Portanto, torna-se de extrema importância o entendimento dos mecanismos envolvidos nesse processo para que novos e eficazes tratamentos sejam propostos e que intervenções clínicas possam ser feitas precocemente.

#### 1.4. TERMOSENSAÇÃO E TRANSDUÇÃO DOS SINAIS TÉRMICOS

Mecanismos complexos de percepção térmica foram desenvolvidos pelos animais em resposta a mudanças de temperatura no ambiente (SAITO & TOMINAGA, 2015). O conhecimento acerca da termosensação cutânea e dos mecanismos da transdução térmica intrínseca ao sistema nervoso periférico evoluiu significativamente nos últimos anos (CATERINA, 2007), principalmente após a descrição do primeiro receptor térmico em ratos, o receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1 (TRPV1). Em roedores, a família de receptores de potencial transitório (TRP's) tem sido identificada como uma das principais famílias de receptores relacionados a transdução térmica (DHAKA *et al.*, 2006; SAITO & TOMINAGA, 2015). Os receptores TRPV1 têm sido apontados como os receptores responsáveis pela percepção do calor nocivo e por isso, estão amplamente implicados como mediadores da hiperalgesia térmica, tanto em condições de dor inflamatória, onde se mostram mais expressos, como neuropática (LAING E DHAKA, 2015). Agonistas dos receptores TRPV1 como capsaicina e resiniferotoxina, têm sido utilizados como ferramentas farmacológicas para o estudo da contribuição das vias sensíveis à

capsaicina para o desenvolvimento de respostas nociceptivas. O uso de altas doses destes agonistas, em animais neonatos ou adultos, por diversas vias de administração, leva à citotoxicidade por cálcio em neurônios de pequeno a médio diâmetro que expressam receptores TRPV1, através do influxo maciço de íons para o interior destas células (LADAROLA & MANNES, 2015).

Evidências adicionais para a participação dos canais TRP como sensores térmicos surgiram com a clonagem de dois canais iônicos que parecem mediar a detecção do frio (MCKEMY *et al.*, 2002; STORY *et al.*, 2003). O primeiro suposto receptor de frio clonado foi inicialmente denominado CMR1 (*cold menthol receptor 1*), devido à sua ativação em resposta à aplicação de mentol (MCKEMY *et al.*, 2002; PEIER *et al.*, 2002). Este receptor, atualmente denominado TRPM8 (receptor de potencial transitório com domínios de melastatina tipo 8), é expresso em 5 a 10% dos neurônios dos gânglios da raiz dorsal (DRG) e trigeminal (TG), e possui limiar de ativação em torno de 25°C (BABES *et al.*, 2011; PEIER *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Tempo depois, foi identificado outro receptor TRP ativado por temperaturas menores que 17°C, o que se aproxima do limiar de frio nocivo para humanos (15°C) (DAVIS & POPE, 2002). Inicialmente denominado de ANKTM1, este receptor atualmente é chamado de TRPA1 (receptor de potencial transitório com domínios de anquirina 1; STORY *et al.*, 2003).

Além de diferirem quanto ao limiar de temperatura para ativação, os receptores TRPA1 e TRPM8 diferem quanto a sua estrutura e ativação química. Enquanto o receptor TRPA1 é ativado por compostos pungentes, como cinamaldeído e isotiocianato de alila, componentes dos óleos de canela e mostarda, respectivamente e por estímulos mecânicos, o segundo é ativado por mentol, eucaliptol e outros compostos relacionados (BANDELL *et al.*, 2004; BEHRENDT *et al.*, 2004; BHARATE & BHARATE, 2012). No entanto, a despeito da pronunciada diferença estrutural, um composto refrescante sintético, denominado icilina, constitui um grande ativador, comum de ambos receptores (STORY *et al.*, 2003).

Outra diferença entre os receptores TRPA1 e TRPM8 está na expressão dos mesmos nos diferentes tipos de fibras nociceptivas. Estudos apontam que receptores TRPA1 são altamente expressos em uma subpopulação de receptores que também expressam TRPV1, aproximadamente 40% das fibras sensoriais de pequeno diâmetro do DRG de ratos, porém neurônios contendo apenas TRPA1 são encontrados. Receptores TRPM8 são expressos por uma sub-população diferente de fibras C e por um grupo de fibras mielinizadas do tipo A $\delta$ , em DRG, gânglio trigeminal, terminações nervosas livres na epiderme e camadas mais profundas da pele (STORY *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*,

2005, BABES *et al.*, 2011; FERRANDIZ-HUERTAS *et al.*, 2014). É descrito, portanto que a administração crônica de resiniferotoxina elimina a maioria ou por completo os neurônios positivos também para TRPA1, tornando-se uma importante ferramenta farmacológica para a caracterização do envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 na mediação de diferentes processos patológicos (PECZE *et al.*, 2009).

Em relação aos fenômenos sensoriais, a função desses receptores parece também diferir. Enquanto a hiperalgesia ao frio parece ser mediada pelos receptores TRPA1, os receptores TRPM8 são sensores do frio não nocivo e da sensação de refrescância, evocada por substâncias como o mentol (BHARATE & BHARATE, 2012). Em modelos de dor neuropática induzida por lesão de nervos, há relatos do aumento da expressão dos receptores TRPV1 e TRPA1, cerca de 35%, mas não de receptores TRPM8 nos gânglios da raiz dorsal (DRGs) e da ocorrência de hiperalgesia ao frio coincidindo com a *up regulation* de receptores TRPA1 em um tipo específico de neurônios sensoriais (OBATA *et al.*, 2005, FREDERICK *et al.*, 2007). Ainda utilizando modelos de neuropatia induzida por lesão de nervo, Caspani e colaboradores, (2009) demonstraram que 2 dias após a constrição do nervo ciático, camundongos exibiram aumento das respostas nociceptivas ao frio e à administração de mentol. Curiosamente, a expressão dos receptores TRPA1 e TRPM8 nos DRGs estava significativamente reduzida após a lesão do nervo (CASPANI *et al.*, 2009).

Em modelos de dor neuropática diabética, pouco se tem avançado no conhecimento acerca dos fenômenos de percepção ao frio e o envolvimento dos receptores TRPA1 e TRPM8. Nesse sentido, Pabbidi e colaboradores, (2007) demonstraram que camundongos com diabetes induzido por STZ desenvolvem fases distintas de resposta a estímulos térmicos (i.e. uma fase inicial de hiperalgesia e tardiamente, desenvolvem hipoalgesia). Os mesmos autores ainda descrevem que camundongos diabéticos exibiram respostas aumentadas à instilação sub-plantar de acetona (um estímulo de refrescância) e que em DRGs dissecados de animais com hiperalgesia havia uma redução na correntes mediadas por receptores TRPM8. Corroborando com a hipótese de que na fisiopatologia do diabetes e suas complicações há também uma possível participação dos receptores TRPA1, Trevisani e colaboradores, (2007) identificaram como um possível ativador endógeno dos receptores TRPA1, o HAE, o sub-produto da lipoperoxidação, cujos níveis encontram-se elevados no diabetes (CUNHA *et al.*, 2007). Outro produto resultante do componente hiperglicêmico do diabetes é o metilglioal, que também é capaz de ativar o receptor TRPA1 (ANDERSSON *et al.*, 2015). Além disso, animais diabéticos desenvolvem

nítido aumento da resposta nociceptiva à injeção intraplantar de formalina, um agonista não seletivo de receptores TRPA1 (SCHREIBER *et al.*, 2012). Ademais, em modelos de hiperglicemia induzida por dieta rica em D-glicose, Lungu e colaboradores, (2007) observaram que os ratos hiperglicêmicos exibem significativo aumento das respostas nociceptivas à instilação de acetona quando comparados aos animais normoglicêmicos da 4<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana (LUNGU *et al.*, 2007).

Considerando o exposto acima, parece plausível hipotetizar que as alterações na percepção ao frio (i.e. hipoalgesia, hiperalgesia ou alodinia) que, clinicamente acompanham os quadros neuropáticos de origem diabética, sejam decorrentes de anormalidades na função dos receptores TRPA1 e TRPM8.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o decurso temporal das alterações na percepção ao frio no diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina (STZ), correlacionando-as com o desenvolvimento da alodinia mecânica e caracterizando o envolvimento dos receptores TRPA1 e TRPM8.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Correlacionar o decurso temporal das alterações na percepção ao frio e mecânica no diabetes experimental induzido por STZ, caracterizando fenômenos como hipoalgesia, hiperalgesia ou alodinia;
- Avaliar o comportamento nociceptivo dos ratos diabéticos após a administração intraplantar de agonistas de receptores TRPA1 e TRPM8;
- Avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 nas alterações no limiar mecânico de animais diabéticos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Ratus norvegicus*), pesando de 180 a 220 gramas no início do experimento, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Paraná. Os animais permaneceram cerca de 2 dias no biotério do Departamento de Farmacologia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água, antes de terem sido submetidos aos ensaios. Os animais diabéticos foram mantidos em número reduzido por caixa, com maravalha trocada diariamente. Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com as normas e legislações estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (aprovação CEUA/BIO – UFPR #649).

#### 3.2 INDUÇÃO DO DIABETES

O diabetes foi induzido experimentalmente através de injeção única intraperitoneal de 50 mg/Kg de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, diluída em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5) em ratos submetidos previamente a jejum de 12 horas. O diabetes foi confirmado três dias após a injeção de STZ (grupos DBT). Para isso, amostras de aproximadamente 5  $\mu$ L de sangue da veia caudal foram adicionadas em fitas teste impregnadas de glicose oxidase (*Accu-Check Active<sup>TM</sup>*, Roche). Animais que apresentaram glicemia inferior a 250 mg/dL no início (3 dias após a administração de STZ) e ao fim do experimento foram retirados do estudos. Animais normoglicêmicos (NGL) receberam apenas tampão citrato.

#### 3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

##### 3.3.1 ESTIMULAÇÃO TÉRMICA POR FRIO

Para a verificação das alterações na percepção ao frio ao longo do diabetes experimental induzido por STZ, os animais foram submetidos ao teste de instilação plantar de acetona. Animais diabéticos e normoglicêmicos foram ambientados por 15 minutos em caixas de acrílico, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5mm<sup>2</sup>, constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura. Após esse período de adaptação, um jato de 100  $\mu$ L de acetona foi instilado no centro de qualquer uma das patas traseiras por uma seringa de insulina a uma distância máxima de 5 mm, através da malha da caixa de

observação (adaptado de WERNER *et al*, 2007). O número de eventos nociceptivos, sacudidas (*flinches*) e episódios de lambidas da pata devido ao esfriamento provocado pela evaporação da acetona foram contados por 2 minutos a partir da instilação e o número total usado como um índice de resposta ao estímulo térmico de frio. O aumento e/ou redução significativos desse índice foram interpretados como alodinia ou hipoalgesia ao frio, respectivamente. Os índices de resposta ao frio (basais, 1, 2, 3 e 4 semanas após a administração de STZ) foram calculados como média de duas aferições realizadas com o intervalo mínimo de 5 minutos entre elas.

### 3.3.2 ESTIMULAÇÃO MECÂNICA

A alodinia mecânica foi avaliada por meio do teste de pressão crescente na pata de ratos (Von Frey eletrônico), aplicado por um anesthesiômetro eletrônico (*IITC Life Science*, California, EUA). O aparelho possui um transdutor de força conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de força com a pata é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados nas mesmas caixas de acrílico descritas acima para ambientação por 15 minutos antes da aplicação, por entre as malhas da rede, de uma força linearmente crescente no centro da planta da pata. O estímulo foi cessado quando o animal produziu uma resposta de retirada e/ou sacudida da pata estimulada. A alodinia mecânica foi então quantificada como média da força obtida após três aferições em cada uma das patas traseiras (adaptado de YAMAMOTO *et al*, 2009) no estado basal antes da administração de STZ (grupo DBT) ou tampão citrato (grupo NGL) e semanalmente, durante 4 semanas após a indução do diabetes.

### 3.3.3 ESTIMULAÇÃO QUÍMICA

Na quarta semana após a indução química do diabetes por STZ ou da injeção de tampão citrato (ratos normoglicêmicos), os animais foram colocados individualmente em um cilindro transparente onde permaneceram por 20 minutos para ambientação antes da injeção intraplantar de um volume de 50µL de agonistas de receptores TRPA1 (óleo de mostarda, concentrações de 0,1%, 0,5% e 1%) (adaptado de HAMITY *et al*, 2010) e TRPM8 (mentol, concentrações de 0,1%, 0,5% e 1%), ou veículo (óleo de milho). Em seguida, a quantidade de *flinches* foi avaliado com intervalos de 5 minutos por um período total de 20 minutos.

### 3.3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AGONISTA DO RECEPTOR TRPA1 SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE ANIMAIS DIABÉTICOS

Na quarta semana após a indução do diabetes experimental, animais normoglicêmicos e diabéticos passaram por uma avaliação basal do limiar mecânico e em seguida receberam injeção intraplantar do agonista do receptor TRPA1 (óleo de mostarda, 50µl, concentrações de 0,1%, 0,5% ou 1%) ou veículo (óleo de milho). O limiar mecânico de animais foi avaliado após uma ambientação de 15 a 20 minutos no aparato de Von frey eletrônico. Os resultados foram avaliados através de uma comparação entre os valores basais antes da indução do diabetes, basais na 4ª semana e após a injeção.

### 3.3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR TRPA1 SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE ANIMAIS DIABÉTICOS

Na quarta semana após a indução do diabetes experimental, animais diabéticos passaram por uma avaliação basal do limiar mecânico e em seguida receberam injeção intraplantar de um antagonista do receptor TRPA1 (HC030031, 40µL, 300µg/pata) ou veículo (óleo de milho). A dose utilizada foi escolhida através de estudo prévio no modelo de dor neuropática por constrição do nervo ciático (dados não publicados). O limiar mecânico de animais, tratados tanto com veículo quanto com o antagonista, foi então avaliado com uma média de três aferições na pata ipsilateral em intervalos de 1 hora durante 4 horas. Para avaliar que a dose utilizada de antagonista não induziu efeito sistêmico, a pata contralateral a injeção também foi estimulada pelo teste de Von frey eletrônico (dados não apresentados).

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

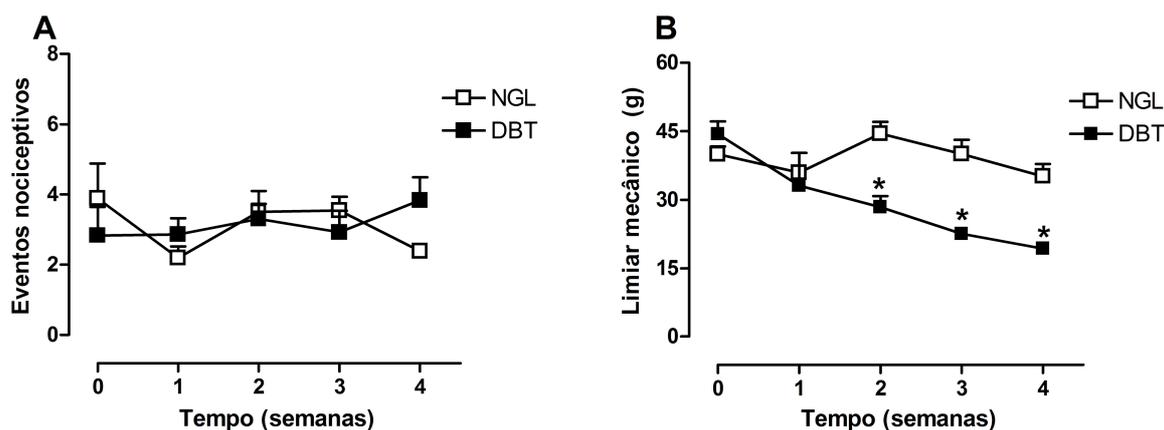
Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de 6 a 9 animais por grupo experimental. Os dados foram analisados por meio de Test t para comparação entre os grupos normoglicêmico e diabético nas avaliações do limiar mecânico e de sensibilidade ao frio, ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls ou ANOVA de duas vias (tratamento e tempo) seguido do teste de Bonferroni para comparações entre os grupos experimentais. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DECURSO TEMPORAL DE RESPOSTA AO FRIO E AO ESTÍMULO MECÂNICO

Animais diabéticos e normoglicêmicos foram submetidos ao teste de instilação de acetona previamente a administração de STZ ou tampão citrato e semanalmente durante 4 semanas. Animais diabéticos não mostraram diferença significativa quanto ao número de eventos nociceptivos desencadeados após a instilação de acetona quando comparado ao grupo normoglicêmico (Figura 1A; Basal: NGL=3,885 ± 0,9922, DBT=2,833 ± 0,8115; 1ª semana: NGL=2,192 ± 0,3272, DBT=2,733 ± 0,4222; 2ª semana: NGL=3,500 ± 0,5938, DBT=3.300 ± 0,3229; 3ª semana: NGL=3,538 ± 0,3941, DBT=2,900 ± 0,5798; 4ª semana: NGL=2,385 ± 0,1974, DBT=3,767 ± 0,5212;).

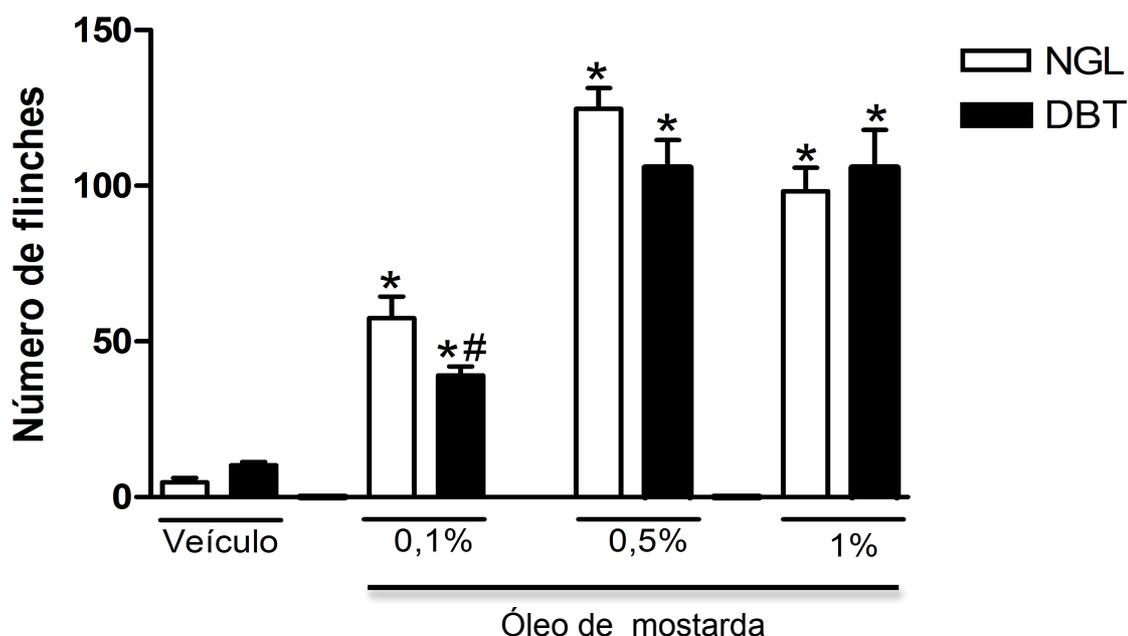
Os mesmos grupos de animais foram também avaliados semanalmente quanto ao limiar mecânico através do aparelho de Von frey eletrônico. Animais diabéticos apresentaram um limiar mecânico reduzido a partir da segunda semana após a administração de STZ, quando comparado ao grupo normoglicêmico, e tal redução foi mantida durante a 3ª e 4ª semana de avaliação. (Figura 1B; Basal: NGL= 39,96 ± 3,84, DBT=44,41 ± 6,679; 1ª semana: NGL=35,94 ± 2,63, DBT=33,05 ± 17,53; 2ª semana: NGL=44,49 ± 5,71, DBT=28,39 ± 5,89; 3ª semana: NGL=40,04 ± 6,78, DBT=22,53 ± 3,23; 4ª semana: NGL=35,15 ± 6,01, DBT=19,27 ± 3,12;).



**Figura 1. Decurso temporal de alterações nas respostas nociceptivas ao estímulo térmico de frio e ao estímulo mecânico.** (A) Avaliação semanal do teste de instilação de acetona e (B) do limiar mecânico através do teste de Von frey eletrônico em animais normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT) (n= 6-9). Valores representam a média ± EPM e (\*) indica  $p \leq 0,05$  na comparação entre os grupos.

#### 4.2 RESPOSTA NOCICEPTIVA AO AGONISTA DO RECEPTOR TRPA1

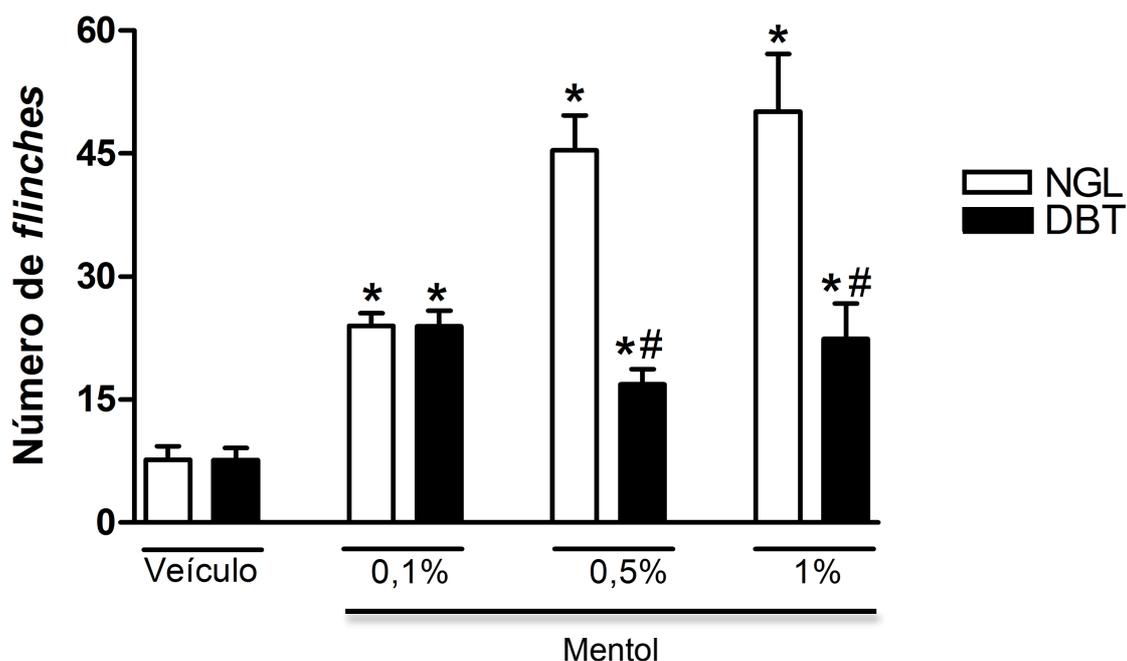
Na quarta semana após a indução do diabetes experimental, animais normoglicêmicos e diabéticos receberam injeção intraplantar de uma solução de óleo de mostarda, um agonista do receptor TRPA1, e o número de *flinches* foi contabilizado (Figura 2). Os grupos de animais não mostraram diferença significativa no número de *flinches* desencadeados pela injeção de óleo de mostarda nas doses de 0,5% e 1% ou somente veículo (Veículo: NGL=4,86 ± 1,405, DBT=10,31 ± 1,043; 0,5%: NGL=124,8 ± 6,625, DBT=105,8 ± 8,956; 1%: NGL=98,25 ± 7,598, DBT=105,8 ± 12,25). O grupo de animais diabéticos mostrou uma resposta nociceptiva menor em comparação ao grupo normoglicêmico na concentração de 0,1% de óleo de mostarda (0,1%: NGL= 57,54 ± 6,919, DBT=39,14 ± 2,890).



**Figura 2. Resposta nociceptiva direta a injeção do agonista TRPA1, óleo de mostarda.** Número total de flinches desencadeados após injeção intraplantar de 50µl de uma solução de óleo de mostarda nas concentrações de 0,1%, 0,5% ou 1% em diferentes grupos experimentais de animais diabéticos (DBT) e normoglicêmicos (NGL) (n= 6-9). Valores representam Média ± EPM, (\*) indica  $p \leq 0,05$  na comparação entre os respectivos grupos veículo e (#) indica  $p \leq 0,05$  na comparação entre os grupos apenas na dose de 0,1%.

### 4.3 RESPOSTA NOCICEPTIVA AO AGONISTA DO RECEPTOR TRPM8

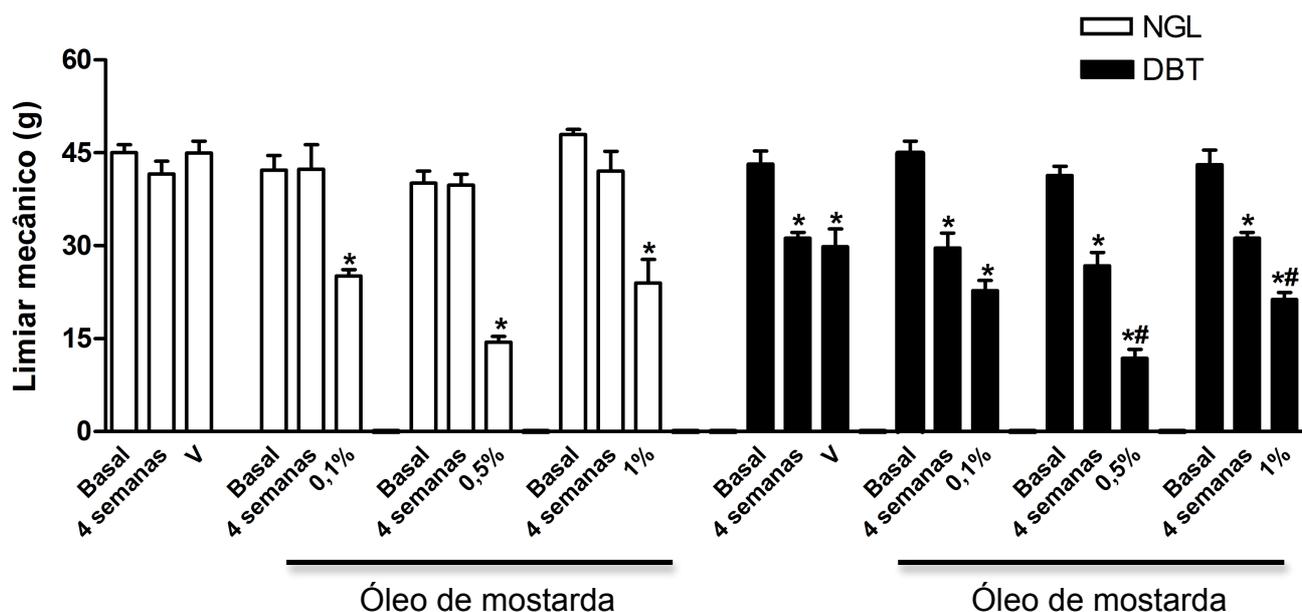
Também na quarta semana após a administração de estreptozotocina, animais normoglicêmicos e diabéticos receberam injeção intraplantar de uma solução de mentol, um agonista do receptor TRPM8, e o número de *flinches* foi contabilizado (Figura 3). Os grupos diabético e normoglicêmico não mostraram diferença significativa no número de *flinches* na concentração de 0,1% (Veículo: NGL=7,70 ± 1,633, DBT=7,636 ± 1,503; 0,1%: NGL=24,00 ± 1,549, DBT=23,92 ± 1,921). No entanto, nas concentrações de 0,5% e 1% de mentol, animais diabéticos apresentaram um número reduzido no total de *flinches* em comparação aos respectivos grupos de animais normoglicêmicos (0,5%: NGL=45,40 ± 4,273, DBT=16,90 ± 1,835; 1%: NGL=50,11 ± 7,086, DBT=22,43 ± 4,303).



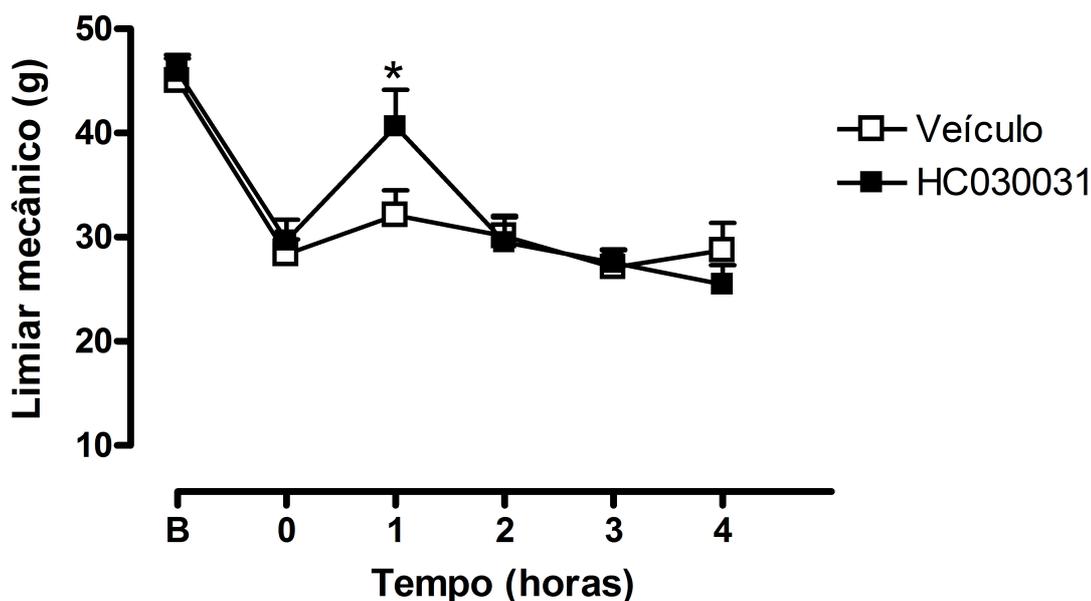
**Figura 3. Resposta nociceptiva direta a injeção do agonista TRPM8, mentol.** Número total de *flinches* desencadeados após injeção intraplantar de 50µL de uma solução de mentol nas concentrações de 0,1%, 0,5% ou 1% em diferentes grupos experimentais de animais diabéticos (DBT) e normoglicêmicos (NGL) (n= 6-9). Valores representam Média ± EPM, (\*) indica p≤0,05 na comparação entre os respectivos grupos veículo e (#) indica p≤0,05 na comparação entre os grupos nas doses de 0,5% e 1%.

#### 4.4 ALTERAÇÃO NO LIMIAR MECÂNICO FRENTE AO AGONISTA E ANTAGONISTA TRPA1

Grupos de animais normoglicêmicos e diabéticos passaram por um teste basal do limiar mecânico previamente e 4 semanas após a indução do diabetes por estreptozotocina e então receberam injeção intraplantar de 50 $\mu$ l do agonista TRPA1 óleo de mostarda (concentrações de 0,1%, 0,5% e 1%) ou veículo (óleo de milho). Em seguida o limiar mecânico da pata ipsilateral foi novamente avaliado (Figura 4). Animais normoglicêmicos não desenvolveram alodinia mecânica na 4<sup>a</sup> semana, porém o limiar mecânico foi alterado após a administração do agonista TRPA1 em todas as doses. Por sua vez, animais diabéticos desenvolveram alodinia mecânica na quarta semana após a indução do diabetes, e a injeção intraplantar do agonista TRPA1 nas concentrações de 0,5% e 1% reduziu ainda mais o limiar mecânico desses animais.



**Figura 4. Sensibilidade mecânica de animais normoglicêmicos e diabéticos após tratamento com agonista TRPA1, óleo de mostarda.** Avaliação do limiar mecânico dos grupos normoglicêmicos e diabéticos (n=6-9) antes e 4 semanas após a indução do diabetes experimental e posteriormente a injeção intraplantar de óleo de mostarda nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1% ou veículo. Valores representam a média  $\pm$  EPM, (\*) indica  $p \leq 0,05$  na comparação com o limiar mecânico basal de cada grupo e (#) indica diferença em comparação ao limiar mecânico na 4<sup>a</sup> semana após a indução do diabetes.



**Figura 5. Sensibilidade mecânica de animais diabéticos após tratamento com antagonista TRPA1, HC030031.** Decurso temporal de 4 horas apresentando o limiar mecânico de animais diabéticos (n= 6-9) após injeção intraplantar de 40 $\mu$ l de uma solução HC030031 na dose de 300 $\mu$ g por pata. Valores representam a média  $\pm$  EPM, (\*) indica  $p \leq 0,05$  na comparação com o grupo de animais diabéticos que receberam veículo.

Um grupo de animais diabéticos foi submetido a uma medida basal do estímulo mecânico na quarta semana após a injeção de estreptozotocina e em seguida estes animais receberam injeção intraplantar de 40 $\mu$ L (dose de 300 $\mu$ g/pata) de HC030031, um antagonista TRPA1, ou veículo (óleo de milho). O limiar mecânico desses animais foi avaliado de uma em uma hora, durante um decurso total de 4 horas (Figura 5).

Animais diabéticos apresentaram um limiar mecânico reduzido na quarta semana em comparação com o valor basal prévio a indução do diabetes experimental. O tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 foi capaz de reduzir a sensibilidade mecânica somente na primeira hora após o tratamento.

## 5 DISCUSSÃO

Alterações sensoriais em pacientes diabéticos são amplamente descritas e discutidas tanto quanto os diversos mecanismos envolvidos no estabelecimento da neuropatia diabética. O modelo de indução do diabetes por estreptozotocina, um antibiótico extraído da espécie bacteriana *Streptomyces acromogenes*, é um dos mais usados e bastante estabelecido para a pesquisa de diversas complicações relacionadas ao diabetes, dentre elas a neuropatia (BIESSELS *et al.*, 2014; JUNOD *et al.*, 1967; REUSSER, 1971).

Apesar da importância das alterações mecânicas como um sinal clínico grave na neuropatia diabética, as alterações na percepção de temperatura parecem ser ainda mais relevantes e variáveis. Estudos utilizando modelos animais de diabetes relatam respostas inalteradas, exacerbadas ou reduzidas quanto a estímulos térmicos (MORGADO e TAVARES *et al.*, 2007).

No presente estudo, ratos diabéticos mostraram uma resposta inalterada ao estímulo de frio (instilação de acetona) quando comparado ao grupo normoglicêmico nas 4 semanas avaliadas. Este resultado não corrobora ao descrito por outros autores no modelo de dor neuropática por constrição crônica do nervo ciático. Dados prévios do nosso grupo também mostraram que animais constritos desenvolveram hiperalgesia ao frio no teste de placa fria e alodinia ao frio no teste de acetona (Dados não publicados). Caspani e colaboradores (2009) e Xing e colaboradores (2007), através do teste de acetona também mostraram o desenvolvimento de alodinia ao frio em animais constritos (XING *et al.*, 2007; CASPANI *et al.*, 2009). Recentemente, Farshid e Tamaddonfard (2015) utilizando um protocolo diferente do teste de acetona, onde o número de instilações foi maior que o do presente trabalho, mostraram que animais diabéticos desenvolvem alodinia ao frio 20 dias após a indução do diabetes e tal alteração permanece significativa por até 50 dias (FARSHID e TAMADDONFARD, 2015).

Resultados conflitantes podem ocorrer porque algumas variáveis de respostas térmicas, principalmente em animais diabéticos, são desconsideradas. As temperaturas basais da pele da pata dos animais devem ser consideradas, pois estas já mostraram interferir em respostas de hipotermia devido aos danos em fluxo sanguíneo na região distal, que é uma característica do estado diabético. De acordo com o estudo de Sawamura (2002), a temperatura da pele da cauda de ratos pode influenciar o tempo de latência no teste Tail Flick em 0,3 segundos (SAWAMURA *et al.*, 2002). O fator se torna ainda mais importante quando substâncias de rápida volatilidade como acetona, são aplicadas. Tais

alterações e resultados sugerem uma abordagem de resposta para ausência de responsividade direta nos 2 minutos de teste de acetona utilizados no presente trabalho (MORGADO e TAVARES *et al.*, 2007). (SAWAMURA *et al.*, 2002).

O receptor TRPM8 é descrito como um dos mediadores da transdução de temperaturas ditas não nocivas a partir de 28° C até 18° C (McKEMY *et al.*, 2002) e por via tópica o agonista do receptor TRPM8 (mentol) já mostrou ser capaz de desencadear alodinia ao frio em um estudo clínico (WASNER *et al.*, 2004). Por essas razões, TRPM8 pode desempenhar papel fundamental na alodinia ao frio detectada em modelos de dor neuropática. Porém, dados conflitantes são encontrados. Su e colaboradores (2011) descreveram um aumento no número de neurônios positivos para o receptor TRPM8 em DRG de ratos submetidos à constrição do nervo ciático. Caspani e colaboradores, por sua vez, descreveram níveis de transcrito para TRPM8 reduzidos em DRG de ratos operados (CCI) (CASPANI *et al.*, 2009). Em ratos diabéticos, Nam e colaboradores (2014), através da técnica de western blot, detectaram um aumento nos níveis de TRPM8 no DRG (NAM *et al.*, 2014). No presente estudo, animais diabéticos que receberam injeção intraplantar de mentol, em diferentes doses, desencadearam um número de *flinches* reduzido (doses de 0,5 e 1%) em comparação ao grupo normoglicêmico na 4ª semana após a indução do diabetes.

Muito é discutido sobre os mecanismos de regulação da atividade do receptor TRPM8 e também de sua participação como analgésico e dessensibilizador de fibras C. Zhang e colaboradores em 2008, mostraram que por ativação de receptores GABA<sub>A</sub>, mentol conseguiu exercer atividade supressora em neurônios de componentes centrais (ZHANG *et al.*, 2007). Da mesma forma, Gaudio e colaboradores (2012) indicaram que mentol pode atuar como inibidor dependente do estado dos canais de sódio Nav. 1.8 e Nav. 1.9 e também canais de sódio sensíveis a tetrodotoxina. Esses canais são importantes no processo de disparos repetitivos em condições de excitabilidade e também hiperexcitabilidade relacionada a dor (GAUDIOSO *et al.*, 2012).

Quanto a sua regulação, TRPM8, assim como TRPA1, também é regulado pela via PLC/PIP<sub>2</sub>, porém PIP<sub>2</sub> exerce função ativadora do receptor TRPM8. PLC atua na conversão de PIP<sub>2</sub> em DAG e IP<sub>3</sub>, e estudos indicam um aumento da sua atividade, gerando redução nos níveis de PIP<sub>2</sub>, o que pode contribuir para limitações na ativação do receptor TRPM8 (YUDIN & ROHACS *et al.*, 2012; KUSUDA *et al.*, 2013).

As alterações na sensibilidade mecânica em animais diabéticos podem ser estabelecidas desde alguns dias até algumas semanas após a indução do diabetes. A

alodinia mecânica (avaliada no teste de Von frey) observada no presente estudo a partir da 2ª semana pós STZ está de acordo com achados prévios. No trabalho de Bishnoi e colaboradores em 2011, animais diabéticos desenvolveram alodinia mecânica na quarta semana após a indução do diabetes (BISHNOI *et al.*, 2011). Da mesma forma, Beyreuther e colaboradores (2006), através do teste de pressão na pata, (randall selito), mostraram que animais diabéticos desenvolveram hiperalgesia mecânica 21 dias após a indução do diabetes experimental (BEYREUTHER *et al.*, 2006). Cunha e colaboradores em 2009 mostraram que a hipersensibilidade mecânica em animais diabéticos encontrada a partir de 19 dias após a injeção de estreptozotocina foi independente ao estado hiperglicêmico (CUNHA *et al.*, 2009).

A alodinia mecânica é um dos mais importantes e severos sintomas de dor e de desenvolvimento da neuropatia. Porém, os mecanismos pelos quais a alodinia mecânica é estabelecida na neuropatia diabética permanecem incompletamente esclarecidos. Estudos mostram que a alodinia é desenvolvida independentemente do estado hiperglicêmico, pois mesmo animais que receberam doses de estreptozotocina, e que não ficaram hiperglicêmicos ou diabéticos, mostraram desenvolvimento de alodinia mecânica. Tais resultados levantam a hipótese de que a hipersensibilidade mecânica pode não estar relacionada apenas a hiperglicemia, mas também a administração de estreptozotocina (BISHNOI *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2009). Andersson e colaboradores (2015) mostraram que estreptozotocina ativou TRPA1 em experimentos *in vitro*. Além disso, quando injetada por via tópica (i.pl. 1-100µg/25µl), foi capaz de induzir uma hiperalgesia polimodal em camundongos, enquanto que, na administração sistêmica (i.p. 180 mg/Kg/2mL) levou ao desenvolvimento de perda sensorial crônica. O mecanismo sugerido seria uma oxidação dos resíduos de cisteína que compõe a estrutura do receptor. (ANDERSSON *et al.*, 2015)

No presente estudo o receptor TRPA1 mostrou estar potencialmente envolvido na patofisiologia da dor neuropática, já que ao receber injeção intraplantar de um antagonista TRPA1, HC030031, animais diabéticos mostraram um aumento no limiar mecânico, avaliado através do teste de Von frey eletrônico. Porém, tal efeito foi encontrado somente na primeira hora após tratamento. Este resultado está de acordo com o que já foi encontrado em relação ao uso de antagonistas TRPA1 no tratamento para alterações sensoriais mecânicas. Wei e colaboradores (2009) mostraram que animais diabéticos desenvolveram uma hipersensibilidade mecânica 10 dias após a indução do diabetes e o tratamento agudo e sistêmico com um antagonista TRPA1 conseguiu produzir um efeito antihiperálgico de 15 a 60 minutos durante o teste de pressão da pata. Os mesmos

autores também encontraram o mesmo efeito usando tratamento intratecal com um antagonista TRPA1, mas um nenhum efeito com a injeção intraplantar do antagonista (WEI *et al.*, 2009; WEI *et al.*, 2010). Em um estudo utilizando tratamento sistêmico com o antagonista HC030031, Barrière e colaboradores (2012) também mostraram que animais diabéticos tiveram a hiperalgesia ao frio, induzida pelo diabetes em associação ao tratamento crônico com paclitaxel, reduzida nos primeiros 15 e 30 minutos após o tratamento (BARRIÈRE *et al.*, 2012).

No entanto, TRPA1 não se mostrou ativado após a injeção de um agonista, óleo de mostarda, em animais diabéticos. Pelo contrário, na menor dose de agonista testada (0,1%), animais diabéticos desencadearam um número de *flinches* menor em comparação ao grupo normoglicêmico. Em outros modelos de dor neuropática, resultados conflitantes são encontrados. No trabalho de Caspani em 2009, com o modelo de contração do nervo ciático (CCI) de camundongos, foi demonstrado que animais operados apresentavam uma redução de neurônios responsáveis à óleo de mostarda (CASPANI *et al.*, 2009). Também utilizando o modelo CCI, Pinheiro e colaboradores (2015) demonstraram que animais operados desencadeavam uma resposta exacerbada, com relação ao número de lambidas e sacudidas da pata, após a injeção do agonista TRPA1 alil-isotilcianato (PINHEIRO *et al.*, 2015). Por fim, Wei e colaboradores demonstraram que animais controle saudáveis desenvolveram hipersensibilidade mecânica 10 e 30 minutos após a injeção de óleo de mostarda (WEI *et al.*, 2010).

O papel de agonistas TRPA1 induzindo resposta nociceptiva direta no modelo de neuropatia diabética ainda não está bem determinado. Além disso, no modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, TRPA1 é descrito como um receptor que é potencialmente pré-ativado e sensibilizado por agonistas endógenos inerentes ao estado diabético e produzidos por estresse oxidativo. 4-hidroxinonenal (4-HNE), um produto de peroxidação lipídica possui uma cadeia eletrofílica alfa/beta insaturada que é muito semelhante a encontrada na molécula agonista TRPA1 cinamaldeído. Andersson e colaboradores (2008), usando eletrofisiologia, mostraram que além de 4-HNE, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) também foi responsável pela ativação de células de ovário e de neurônios do gânglio da raiz dorsal (ANDERSSON *et al.*, 2008). Um segundo componente, metilglioxal, um carbonil endógeno, produto intermediário da glicólise, tem sido relacionado ao desenvolvimento da neuropatia diabética. Através de imagem de cálcio, foi mostrado que o metilglioxal participa da ativação do receptor TRPA1, como publicado no trabalho de Ohkawara em 2012. Da mesma forma, Koivisto (2012) mostrou, através de imagem de

cálcio de células recombinantes, que TRPA1 foi ativado por metilglioxal e 4-HNE, sendo que a ativação por metilglioxal foi reduzida, de uma forma dose dependente, por um antagonista TRPA1 (KOIVISTO *et al.*, 2012; OHKAWARA *et al.*, 2012).

A sensibilização de TRPA1 também envolve mediadores que atuam por meio de receptores acoplados a proteína Gq e ativação de fosfolipase C (PLC), enzima responsável pela quebra de fosfatidilinositol- 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). PIP<sub>2</sub> exerce papel como inibidor do receptor TRPA1. Durante estados de dor neuropática, PLC se mostra superativada o que poderia levar a uma depleção de PIP<sub>2</sub> e consequente ativação de TRPA1. (BERTI-MATTERA *et al.*, 1996; THAN *et al.*, 2013).

Além da ativação endógena, a expressão do receptor TRPA1 parece também exercer papel fundamental em diferentes modelos de neuropatia. De uma forma controversa, no modelo CCI, Caspani e colaboradores mostraram um redução no RNA mensageiro para TRPA1 em DRG de animais operados. Porém, no mesmo modelo, animais constrictos apresentaram alodinia ao frio, uma alteração sensorial que pode envolver a ativação de TRPA1(CASPANI *et al.*, 2009). Barrière e colaboradores em 2012, indicaram um aumento no transcrito para TRPA1 em gânglio da raiz dorsal de ratos diabéticos, e também no mesmo modelo, animais diabéticos desenvolveram hiperalgesia ao frio. (BARRIÈRE *et al.*, 2012);

Outros mecanismos, que não a ativação direta do receptor TRPA1 ou de vias periféricas, estão envolvidos no estabelecimento de alodinia mecânica na neuropatia diabética. Estudos funcionais relatam que disfunções dolorosas estão associadas a aumento na atividade de circuitos nociceptivos localizados na região espinal (SILVA *et al.*, 2015). Em 2007, Morgado e Tavares, demonstraram o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica a partir da segunda semana após a indução do diabetes e encontraram um aumento nos níveis de expressão de C-fos, um marcador de ativação neuronal relacionado a estímulos nociceptivos, em segmentos espinais de ratos diabéticos (MORGADO e TAVARES *et al.*, 2007) . No trabalho de Li e colaboradores (2010), foi relatado um aumento nas correntes excitatórias pós-sinápticas na raiz dorsal de ratos diabéticos, e tal alteração estava associada com o aumento da expressão de receptores glutamatérgicos na mesma região (LI *et al.*, 2010). Jolivalt e colaboradores (2008), mostraram que o uso de um antagonista GABA<sub>A</sub>, a bicuculina, foi capaz de reduzir a alodinia mecânica em ratos diabéticos. Enquanto os níveis de KCC<sub>2</sub>, co-transportador responsável por manter reduzidas as concentrações intracelulares de cloreto de potássio, foram encontrados reduzidos no

cordão espinal de ratos diabéticos. Esses achados estão de acordo com o proposto por Coull e colaboradores em 2003, que indicou um potencial de mudança do sistema GABA, de inibitório para excitatório, na medula de ratos com neuropatia resultante de lesão periférica (COULL *et al.*, 2003; JOLIVALT *et al.*, 2008).

De acordo com os dados do presente estudo, TRPA1 possui envolvimento na alodinia mecânica, o que foi revelado através do teste de Von Frey eletrônico e o uso de antagonista do receptor. TRPM8, por sua vez, não mostrou participação evidente na alodinia ao frio avaliada pelo teste de acetona, e numa tentativa de ativar o receptor com o uso de agonista, o mesmo mostrou não contribuir na nocicepção direta avaliada neste estudo. Estudos mais aprofundados são necessários para avaliar o real papel do receptor TRPM8 e também TRPA1 na fisiopatologia das alterações na percepção ao frio na dor neuropática diabética.

## 6 CONCLUSÕES

Alterações na percepção de estímulos mecânicos e térmicos são descritas como componentes importantes do processo de estabelecimento da neuropatia diabética e são usados como critério diagnóstico para avaliação de estágios e gravidade da neuropatia. A hipersensibilidade mecânica foi registrada neste estudo, em animais diabéticos, a partir da segunda semana de avaliação. No entanto, alterações sensoriais relacionadas a percepção de frio não foram encontradas. Isso mostra que, para este estudo, não ocorreu o perfil de alterações sensoriais térmicas predizendo alterações sensoriais mecânicas, como foi hipotetizado inicialmente. E, além disso, as alterações não foram concomitantes.

O receptor TRPA1 se mostrou envolvido no desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica, o que foi evidenciado com o uso de um antagonista que produziu efeito em animais diabéticos. Porém, quanto a sensibilização do receptor, animais diabéticos parecem possuir componentes moleculares que não foram avaliados no estudo mas que podem alterar a função deste receptor.

Por outro lado, o receptor TRPM8 não apresentou a diferença de ativação entre os grupos normoglicêmicos e diabéticos. Estes resultados associado a ausência do desenvolvimento de alodinia mecânica no modelo utilizado, podem evidenciar que o receptor não está envolvido na fisiopatologia da dor neuropática diabética. Porém, estudos mais aprofundados são necessários. Outros receptores podem estar envolvidos nos mecanismos de desenvolvimento da alodinia ao frio.

Em geral, canais da família de receptores de potencial transitório tem mostrado ampla participação em mecanismos de dor de origem neuropática, assim como de origem inflamatória. A busca por alvos terapêuticos e caracterização de mecanismos fisiopatológicos é muito importante para a caracterização da melhor abordagem farmacológica em condições severas como a de neuropatia diabética dolorosa.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRONI, J. H.; BOYKO, E. J.; DAVIGNON, D. R.; PECORARO, R. E. The health and functional status of veterans with diabetes. **Diabetes Care**, v. 17, n.4, p. 318-321, 1994.
- AMERICAN NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Advances and Emerging Opportunities in Diabetes Research: a strategic planning report of the diabetes mellitus interagency coordinating committee, 2011.
- ANDERSON, D. A.; GENTRY, C.; MOSS, S.; BEVAN, S.; Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *The journal of neuroscience*, v. 28, p.2485 – 2494, 2008.
- ANDERSSON, D. A.; FILIPOVIĆ, M. R.; GENTRY, C.; EBERHARDT, M.; VASTANI, N.; LEFFLER, A.; REEH, P.; BEVAN, S. Streptozotocin stimulates the ion channel TRPA1 directly involvement of peroxynitrite. **The journal of biological chemistry**, v. 290, n. 24, p. 12185-15196, 2015.
- ASLAM, A.; SINGH, J.; RAJBHANDARI, S. Pathogenesis of Painful Diabetic Neuropathy. *Pain Research and Treatment*, v.2014, p.1-7, 2014.
- BABES, A., CIOBANU, A. C., NEACSU, C., BABES, RM. TRPM8, a sensor for mild cooling in mammalian sensory nerve nerve endings. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 78-88, 2011.
- BANDELL, M., STORY, G.M., HWANG, S.W., VISWANATH, V., EID, S.R., PETRUS, M.J., EARLEY, T.J., PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, p. 849-857, 2004.
- BARRIÈRE, D. A.; RIEUSEET, J.; CHANTERANNE, D.; BUSSEROLLES, J.; CHAUVIN, M.; CHAPUIS, L.; SALLES, J.; DUBRAY, C.; MORIO, B. Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization. **Pain**, v. 153, p. 553-561, 2012.
- BEHRENDT, H.J., GERMANN, T., GILLEN, C. HATT, H. JOSTOCK, R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. **Br J Pharmacol**, v. 141, p. 737-745, 2004.
- BERTELSMANN, F. W.; HEIMANS, J. J.; VAN ROOY, J. C.; DANKMEIJER, H. F.; VISSER, S. L.; VAN DER VEEN, E. A. Peripheral nerve function in patients with painful diabetic neuropathy treated with continuous subcutaneous insulin infusion. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 50, n. 10, p. 1337-1341, 1987.
- BEYHEUTHER, 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.
- BERTI-MATTERA, L.; DAY, N.; PETERSON, R. G., EICHBERG, J. An aldose reductase inhibitor but not myo-inositol blocks enhanced polyphosphoinositide turnover in peripheral nerve from diabetic rats. *Metabolism*, v. 45, n. 3, p. 320-327, 1996.

- BHARATE, S. S.; BHARATE, S. B. Modulation of thermoreceptor TRPM\* by cooling compounds. **ACS Chem. Neurosci**, v. 3, n. 2, p. 248-257, 2012.
- BISHNOI, M.; BOSGRAAF, C. A.; ABOOJ, M.; ZHONG, L.; PRAMKUMAR, L. S. Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is dependent of glycemic stste of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. **Molecular Pain**, v. 7, n. 52, 2011.
- BIESSELS, G. J.; BRIL, V.; CALCUTT, N. A.; CAMERON, N. E.; COTTER, M. A. DOBROWSKY, R.; FELDMAN, E. L.; FERNYHOUGH, P.; JACOBSEN, J.; MALIK, R. A.; MIZISIN, A. P. OATES, P. J.; OBROSOVA, I. G.; POP-BUSUI, R.; RUSSELL, J. W.; SIMA, A. A.; STEVENS, M. J.; SCHMIDT, R. E.; TESFAYE, S.; VEVES, A.; VINIK, A. I.; WRIGHT, D. E.; YAGIHASHI, S.; YOREK, M. A.; ZIEGLER, D.; ZOCHODNE, D.W. Phenotyping animals models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (Neurodiab). **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 19, p. 77-87, 2014.
- BOULTON, A. J. M.; VINIK, A. I.; AREZZO, J. C.; BRIL, V.; FELDMAN, E. L.; FREEMAN, R.; MALIK, R. A.; MASER, R. E.; SOSENKO, J. M.; ZIEGLER, D. Diabetic Neuropathies, a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, n. 4, 2005.
- BOYER, F.; VIDOT, J. B.; DUBOURG, A. G.; RONDEAU, P.; ESSOP, M. F.; BOURDON, E. Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs. **Oxidative medicine and Cellular Longevity**, V. 2015, 2015.
- BROWN AND MCBRIDE. Impact of the affordable care act on access to care for US adults with diabetes, 2011-2012. **Preventing chronic disease, public health research, practice and policy**, v. 12, n. 64, 2015.
- CALCUTT, N.A.; JORGE, M.C.; YAKSH, T.L.; CHAPLAN, S.R. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. **Pain**, v. 68, n. 2-3, p. 293-299, 1996.
- CASPANI, O., ZURBORG, S., LABUZ, D., HEPPENSTALL, P.A. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7383, 2009.
- CATERINA, M.J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, p. R64–76, 2007.
- CHANTELAU, E. A. Nociception at the diabetic foot, an uncharted territory. **World J Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 391-402. 2015.
- CHARNOGURSKI, G.A., EMANUELE, N.V., EMANUELE, M.A. Neurologic complications of diabetes. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 14, n. 457, 2014.
- CLAUS, D., HILZ, M.J., HUMMER, I., NEUNDÖRFER, B. Methods of measurement of thermal thresholds. **Acta Neurol Scand**, v. 76, n. 4, p. 288-296, 1987.
- COULL, J. A. M.; BOUDREAU, D.; BACHAND, K.; PRESCOTT, S. A.; NAULT, F.; SÍK, A. KONINCK, P.; KONINCK, Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina 1 neurons as a mechanism of neuropathic pain. **Nature**, v. 424, 2003.
- CUNHA, J.M.; JOLIVALT, C.G.; RAMOS, K.M.; GREGORY, J.; CALCUTT, N.A.; MIZISIN, A.P. Elevated lipid peroxidation and DNA oxidation in nerve from diabetic rats: effects of aldose reductase inhibition, insulin, and neurotrophic factors. **Metabolism**, v. 57, n. 7, p. 873-881, 2007.
- CUNHA, J. M.; FUNEZ, M. I. CUNHA, F. Q.; PARADA, C. A. FERREIRA, S.H. Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological research*. v. 42, p. 197-206, 2009.
- DAVIS, K. D. POPE, G. E. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. **Pain**, v. 98, n. 1-2, p. 179-185, 2002.

- DHAKA, A., VISWANATH, V., PATAPOUTIAN, A. Trp ion channels and temperature sensation. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 135–161, 2006.
- DIAS, R. J. S.; CARNEIRO, A. P. Neuropatia diabética: fisiopatologia, clínica e eletroneuromicrografia. **Acta Fisiátrica**, v. 7, p. 35-44, 2000.
- FACER, P., CASULA, M.A., SMITH, G.D., BENHAM, C.D., CHESSEL, I.P., BOUNTRA, C., SINISI, M., BIRCH, R., ANAND, P. Differential expression of the capsaicin receptor trpv1 and related novel receptors trpv3, trpv4 and trpm8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. **BMC Neurology**, 11(7), 2007.
- FARSHID, A. A.; TAMADDONFARD, E.; Histopathological and behavioral evaluations of the effects of crocin, safranal and insulin on diabetic peripheral neuropathy in rats. **Journal of phytomedicine**, v. 5, n. 5, p. 469-478, 2015.
- FERRANDIZ-HUERTAS, C.; MATHIVANAN, S.; WOLF, C. J.; DEVESA, I.; FERRER-MONTIEL, A. Trafficking of thermo TRP channels. **Membranes**, v. 4, p. 525-564, 2014.
- FREDERICK, J.; BUCK, M. E.; MATSON, D. J.; CORTRIGHT, D. N. Increased TRPA1, TRPM8 and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. **Biochemical and Biophysical research Communications**, v. 358, p. 1058-1064, 2007.
- GAUDIOSO, C.; HAO, J.; MARTIN-EAUCLAIRE, M., GABRIAC, M.; DELMAS, P.; Menthol pain relief through cumulative inactivation of voltage-gated sodium channels. **Pain**, v. 153, p. 473-484, 2012.
- GREENE, D. A.; STEVENS, M. J.; OBROSOVA, I.; FELDMAN, E. L. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. **Eur J Pharmacol**, v. 375, n. 1-3, p. 217-223, 1999.
- HALEY, N.; RICHARDS, M. Diabetes: the past, the present, and the challenging future. **CE story**, 2014.
- HAMITY, M. V., WHITE, S. R., HAMMOND, D. L. Effects of neurokinin-1 receptor agonism and antagonism in the rostral ventromedial medulla of rats with acute or persistent inflammatory nociception. **Neuroscience**, v. 162, p. 902, 2010.
- HARATI, Y. Diabetes and the nervous system. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 25, n. 2, p. 325-359, 1996.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: ABOUT DIABETES. Disponível em: <http://www.idf.org/about-diabetes>, Acesso em:19/10/2015.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, Diabetes Atlas Executive Summary, 7<sup>th</sup> edition, 2015.
- JAVED, S. PETROPOULOS, L. N., ALAM, U., MALIK, R. A. Treatment of painful diabetic neuropathy. **Ther adv chronic dis**, v. 6, n. 1, p. 15-29, 2015.
- JENSEN, T.S., GOTTRUP, H., SINDRUP, S.H., BACH, F.W. The clinical picture of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 429, p. 1–11, 2001.
- JENSEN, T.S.; BACKONJA, M. M.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, S.; TESFAYE, S.; VALENSI, P.; ZIEGLER, D. New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. **Diab Vasc Dis Res**, v. 3, n. 2, p. 108-119, 2006.
- JOLIVALT, C. G.; LEE, C.A.; RAMOS, K. M.; CALCUTT, N. A. Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. **Pain**, v. 140, p. 48-57, 2008.
- JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONET, E.; RENOLD, A. E.; Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Exp. Biol. Med.** P. v. 126, p. 201, 1967.
- KALSO, E., ALDINGTON, D. J., MOORE R. A. Drugs for neuropathic pain. **BMJ**, v.347, p.1-6, 2013.
- KING, J.B., SCHAUERHAMER, M.B., BELLOWS ,B.K. A review of the clinical utility of duloxetine in the treatment of diabetic peripheral neuropathic pain. **Ther Clin Risk**, 11:1163-1175, 2015.

- KOBAYASHI, K.; FUKUOKA, T.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; DAI, Y.; TOKUNAGA, A., NOGUCHI, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with Adelta/C-fibers and colocalization with TRK receptors. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 493, p. 596-606, 2015.
- KOIVISTO, A.; HUKKANEN, M.; SAARNILEHTO, M.; CHAPMAN, H.; KUOKKANEN, K.; WEI, H.; VIISANEN, H.; ÅKERMAN, K. E.; LINDSTEDT, K.; PERTOVAARA, A.; Inhibiting TRPA1 ion channel reduces loss of cutaneous nerve fiber function in diabetic animals: sustained activation of the TRPA1 channel contributes to the pathogenesis of peripheral diabetic neuropathy. **Pharmacological Research**, v. 65, p. 149-158, 2012.
- KUSUDA, R.; RAVANELLI, M. I.; CADETTI, F.; FRANCIOSI, A.; PREVIDELLI, K.; ZANON, S.; LUCAS, G. Long-term antidepressant treatment inhibits neuropathic pain-induced CREB and PLC $\gamma$ -1 phosphorylation in the mouse spinal cord dorsal horn. **The journal of pain**, v. 14, n.10, p. 1162-1172, 2013.
- LAING, R. J., DHAKA, A. ThermoTRPs and Pain. **The neuroscientist**, v. 1, p. 17, 2015.
- LADAROLA, M. J., MANNES, A. J. The Vanilloid agonist resiniferatoxin for interventional-based pain control. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 17, p. 2171-2179, 2011.
- LEE, J. H.; McCARTY, R. Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. **Physiol Behav**, v. 47, n. 2, p. 225-230, 1990.
- LEE, J. H.; McCARTY, R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. **Pain**, v. 50, n. 2, p. 231-236, 1992.
- LEE-KUBLI, C. A., MIXCOATL-ZECUAT, T., JOLIVALT, C. G. CALCUTT, N. A. Animals models of diabetes-induced neuropathic pain. **Curr Topics Behav Neurosci**, v.20, p. 147-170, 2014.
- LI, J.; CHEN, S.; CHEN, H.; CAI, Y.; PAN, H. Regulation of increased glutamatergic input to spinal dorsal horn neurons by mGluR5 in diabetic neuropathic pain. **J. Neurochem**, v. 112, p. 162-172, 2010.
- LUNGU, C., DIAS, J.P., FRANÇA, C.E., ONGALI, B., REGOLI, D., MOLDOVAN, F., COUTURE, R. Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 375-87, 2007.
- MCKEMY, D.D., NEUHAUSSER, W.M., JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, v. 416, p. 52-58, 2002.
- MCNAMARA, C.R., MANDEL-BREHM, J., BAUTISTA, D.M., SIEMENS, J., DERANIAN, K.L., ZHAO, M., HAYWARD, N.J., CHONG, J.A., JULIUS, D., MORAN, M.M., FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 13525-13530, 2007.
- MOREIRA, R. O.; LEITE, M. N.; CAVALCANTI, F.; OLIVEIRA, F. J. D. Diabetes Mellitus: Neuropatia. Projeto diretrizes, Associação Médica brasileira e conselho federal de medicina, 2005.
- MORGADO, C.; TAVARES, I. C-fos expression. At the spinal dorsal horn of streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 23, p. 644-652, 2007.
- NAM, J. S.; CHEONG, Y. S.; KARM, M. H.; AHN, H. S.; SIM, J.H.; KIM, J. S.; CHOI, S. S.; LEEM, J. G. Effects of Nefopam on streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain in rats. **Korean J Pain**, v. 27, n. 4, p. 326-333, 2014.
- NAVARRO, X., KENNEDY W.R. Evaluation of thermal and pain sensitivity in type I diabetic patients. **J Neurol Neurosurg Psych**, v. 54, p. 60-64, 1991.
- OBATA, K., KATSURA H, MIZUSHIMA, T., YAMANAKA, H., KOBAYASHI, K., DAI, Y., FUKUOKA, T., TOKUNAGA, A., TOMINAGA, M., NOGUCHI, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin Invest**, v. 115, n. 9, p. 2393-2401, 2005.
- OBROSOVA, I.G. How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve? **Int Rev Neurobiol**, v. 50, p. 3-35, 2002.

- OBROSOVA, I. G. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v.6, p. 638-647, 2009.
- OHKAWARA, S.; TANAKA-KAWAGA, T.; FURUKAWA, Y. JINNO, H. Methylglyoxal activates the human transient receptor potential ankyrin 1 channel. **The journal of toxicological sciences**, v. 37, n.4, p. 831-835, 2012.
- OLIVEIRA, A. F.; VALENTE, J. G.; LEITE, I. C.; SCHRAMM, J. M. A.; AZEVEDO, A. S. R.; GADELHA, A. M. J. Global burden of disease attributable to diabetes mellitus in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, p. 1234-1244, 2009.
- PABBIDI, R.M. Role of Transient Receptor Potential channels in diabetic peripheral neuropathy. <http://gradworks.umi.com/32/95/3295006.html>, 2007.
- PAZDRO, R., BURGESS, J. R. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. **Mechanisms of ageing and development**, v. 131, p. 276-286, 2010.
- PECZE, L., PELSOCI, P., KECSKÉS, M., WINTER, Z., PAPP, A., KASZÁS, K., LETOHA, T., VIZLER, C., OLÁH, Z. Resiniferatoxin mediated ablation of TRPV1+ neurons removes TRPA1 as well. **Can J Neurol Sci**, vol. 36, n. 2, p.234-241, 2009.
- PERGOLIZZI, J.V., RAFFA, R.B., TAYLOR, R., RODRIGUEZ, G., NALAMACHU, S., LANGLEY, P. A review of duloxetine 60 mg once-daily dosing for the management of diabetic peripheral neuropathic pain, fibromyalgia, and chronic musculoskeletal pain due to chronic osteoarthritis pain and low back pain. **Pain Pract**, 13: 239-252, 2013.
- PEIER, A.M., MOQRICH, A., HERGARDEN, A.C., REEVE, A.J., ANDERSSON, D.A., STORY, G.M., EARLEY, T.J., DRAGONI, I., MCINTYRE, P., BEVAN, S., PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 705-715, 2002.
- PELTIER, A., GOUTMAN, S. A., CALLAGHAN, B. C. Painful diabetic neuropathy. **BMJ**, v. 348, p. 1-9, 2014.
- PICON, A. P. Estudo da progressão do diabetes e da neuropatia periférica: classificação da severidade e caracterização cinética da locomoção. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- PINHEIRO, F.V., VILLARINHO, J. G., SILVA, C.S., OLIVEIRA, S. M., PINHEIRO, K. V. PETRI, D., ROSSATO, M. F., GUERRA, G. P., TREVISAN, G., RUBIN, M. A., GEPPETTI, P., FERREIRA, J., ANDRE, E. The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v 747, p. 105-113, 2015.
- REUSSER, F. Mode of action of streptozotocin. **Journal of Bacteriology**, v. 105, n. 2, p. 580-588, 1971.
- SAID, G. Diabetic neuropathy-a review. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 3, n. 6, p. 331-340, 2007.
- SAITO, S., TOMINAGA, M. Functional diversity and evolutionary dynamics of thermo TRP channels. **Cell Calcium**, v. 57, p. 214-221, 2015.
- SAWAMURA, S.; TOMIOKA, T.; HANAOKA, K.; The importance of tail temperature monitoring during tail-flick test in evaluating the nociceptive action of volatile anesthetics. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 46, p. 451-454, 2002.
- SCHREIBER, A. K., NONES, C. F. M., REIS, R., CHICHORRO, J. G., CUNHA, J. M. Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment. **World J Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 432-444, 2015.
- SCHREIBER, A. K.; NEUFELD, M. JESUS, C. H. A.; CUNHA, J. M. Peripheral antinociceptive effect of anadamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 1286-1297, 2012.

- SILVA, M.; MARTINS, D.; TAVARES, I.; MORGADO, C. INHIBITION OF SPINAL 5-HT<sub>3R</sub> reverted diabetes induced mechanical hypersensitivity in a GABA<sub>A</sub> R-mediated neurotransmission-dependent manner. **Neuroscience**, v. 304, p. 228-239, 2015.
- SOUZA, L.A.F.; PESSOA, A.P.C.; FRANCO, L. C.; PEREIRA, L. V. Epidemiologia e qualidade de vida em indivíduos com neuropatia diabética dolorosa: uma revisão bibliográfica. **Rev. Eletr. Enf**; v12, 746-52, 2010.
- STORY, G.M., PEIER, A.M., REEVE, A.J., EID, S.R., MOSBACHER, J., HRICIK, T.R., EARLEY, T.J., HERGARDEN, A.C., ANDERSSON, D.A., HWANG, S.W., MCINTYRE, P., JEGLA, T., BEVAN, S., PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112, n. 6, p. 819-829, 2003.
- SUGIMOTO, K.; MURAKAWA, Y.; SIMA, A. A. F. Diabetic neuropathy – a continuing enigma. **Diabetes Metab. Res. Rev.** n.16 p. 408-433, 2000.
- TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D.; Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes Metab. Res. Rev.** v. 28, p. 8-14, 2012.
- TESFAYE, S., WILHELM, S., LLEDO, A., SCHACHT, A., TÖLLE, T., BOUHASSIRA, D., CRUCCU, G., SKLJAREVSKI, V., FREYNHAGEN, R. Duloxetine and pregabalin: High-dose monotherapy or their combination> The “COMBO-DN study” – a multinational, randomized, double-blind, parallel-group study in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. **Pain**, v.154, p.2616-2625, 2013.
- THAN, J. Y. X. L. RAQUIBUL, H.; ZHANG, X. Excitation and modulation of TRPA1, TRPV1, and TRPM8 channel-expressing sensory neurons by the pruritogen chloroquine. **J. Biol. Chem**, v. 288, p. 12818-12827, 2013.
- TREVISANI, M., SIEMENS, J., MATERAZZI, S., BAUTISTA, D.M., NASSINI, R., CAMPI, B., IMAMACHI, N., ANDRÉ, E., PATACCHINI, R., COTTRELL, G.S., GATTI, R., BASBAUM, A.I., BUNNETT, N.W., JULIUS, D., GEPPETTI, P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 33, p. 13519-13524, 2007.
- VINCENT, A.M.; RUSSELL, J.W.; LOW, P.; FELDMAN, E.L. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocr Rev**, v. 25, n 4, p. 612-628, 2004.
- XING, H.; CHEN, M.; LING, J.; TAN, W.; GU, J.G.; TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. **The journal neuroscience**, v. 27, p. 13680-13690, 2007.
- WAHREN, L.K., TOREBJORK, E. Quantitative sensory tests in patients with neuralgia 11 to 25 years after injury. **Pain**, v. 48, p. 237–244, 1992.
- WASNER, G.; SCHATTSCHNEIDER, J.; BINDER, A.; BARON, R. Topical menthol – a human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors. **Brain**, v. 127, p. 1159-1171, 2004.
- WEI, H.; HÄMÄLÄINEN, M. M.; SAARNILEHTO, M.; KOIVISTO, A.; PERTOVAARA, A. Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. **Anesthesiology**, v. 111, p. 147-154, 2009.
- WEI, H.; CHAPMAN, H.; SAARNILEHTO, M.; KUOKKANEN, K.; KOIVISTO, A.; PERTOVAARA, A. Roles of cutaneous versus spinal TRPA1 channels in mechanical hypersensitivity in the diabetic or mustard oil-treated non-diabetic rat. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 578-584, 2010.
- WERNER, M. F. P., KASSUYA, C. A. L., FERREIRA, J., ZAMPRONIO, A. .R., CALIXTO, J. B., RAE, G. A. Peripheral kinin B1 and B2 receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by nerve ligation in rats. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 48-57, 2007.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION: DIABETES PROGRAMME, Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/en/> Acesso em 10/10/2015.
- YAMAMOTO, H., SHIMISHIGE, Y., YAMAJI, T., MURAI, N., AOKI, T., MATSUOKA, N. Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 57, p. 403-408, 2009.
- YIN, K., ZIMMERMAN, K., VETTER, I., LEWIS, R. J. Therapeutic opportunities for targeting cold pain pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 93, p. 125-140, 2015.
- YUDIN, Y.; ROHACS, T. Regulation of TRPM8 channel activity. **Mol cell Endocrinol**, v. 353, p 68-74, 2012.
- ZHANG, X.; JIANG, P.; GONG, N.; HU, X.; FEI, D.; XIONG, Z.; XU, L.; XU, T. A-type GABA receptor as a central target of TRPM8 agonist menthol. **Plos One**, v. 3, i. 10, 2008.
- ZIEGLER, D., MAYER, P., GRIES, A. Evaluation of thermal, pain, and vibration sensation thresholds in newly diagnosed Type 1 diabetic patients. **J Neurol Neurosurg Psych**, v.51. p. 1420-1424, 1988.
- ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 429, p.23–37, 2001.