

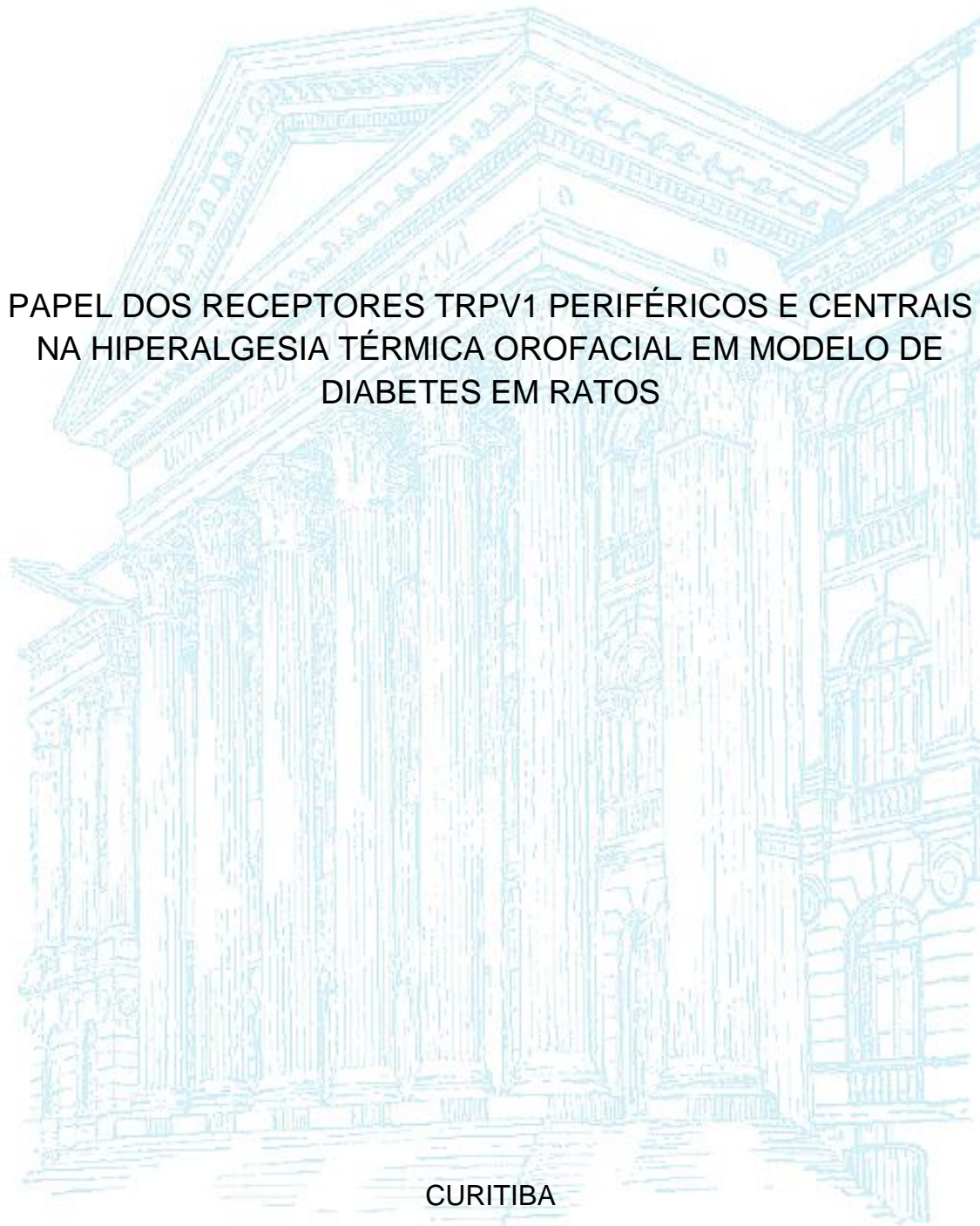
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ERIKA IVANNA ARAYA

PAPEL DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS
NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL EM MODELO DE
DIABETES EM RATOS

CURITIBA

2017



ERIKA IVANNA ARAYA

PAPEL DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS
NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL EM MODELO DE
DIABETES EM RATOS

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^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Araya, Erika Ivanna

Papel dos receptores TRPV1 periféricos e centrais na hiperalgesia térmica orofacial em modelo de diabetes em ratos. / Erika Ivanna Araya. – Curitiba, 2017.

77 f.: 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. Nervo trigêmeo. 3. Hiperalgesia. I. Título II. Chichorro, Juliana Geremias. III. Cunha, Joice Maria da Cunha. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ERIKA IVANNA ARAYA** intitulada: **PAPEL DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL EM MODELO DE DIABETES EM RATOS.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 17 de Fevereiro de 2017.


JULIANA GEREMIAS CHICHORRO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


JOSE MIGUEL AMENÁBAR CÉSPEDES
Avaliador Externo (UFPR)


ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO
Avaliador Interno (UFPR)

Ao meu marido Adriano, por todo amor e apoio incondicional, a força que me ajuda a superar todas as adversidades.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Juliana G. Chichorro, pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e carinho que permitiram a realização deste estudo;

A Prof^a Dr^a. Joice M. Cunha, pela importante co-orientação, por toda ajuda e por toda contribuição no meu aprendizado;

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio e Prof. Dr. José Miguel Amenábar por terem aceito o convite e por suas considerações, as quais contribuíram para a melhoria deste trabalho;

À minha querida amiga Carina F. M. Nones, por toda ajuda recebida, sempre com disposição para auxiliar-me, e especialmente pela avaliação do efeito da insulina no presente trabalho;

Ao Dr. Luiz E. N. Ferreira, por toda colaboração e pela avaliação dos níveis de receptores TRPV1 neste estudo;

À minha querida amiga Dr^a. Rafaela F. Claudino pelos bons momentos de trabalho, por todas as valiosas sugestões e pelo incentivo;

Às estimadas Dr^{as}. Caroline M. Kopruszinski e Renata C. Reis pelo auxílio em experimentos, assim como no meu aprendizado acadêmico;

Aos amigos: Anne, Day, Carlos, Jovia e Karyn pela boa companhia e por toda ajuda;

A toda equipe do laboratório da dor: Franciele, Márcio, Gabriel, Eder, Bruna, Vitória e Aléxia pelos momentos de descontração, pela colaboração do dia a dia e pela paciência nos momentos difíceis.

A todos os amigos e colegas, aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR;

Aos funcionários do biotério, sempre solícitos;

Ao Departamento de Farmacologia da UFPR pela oportunidade;

Aos meus pais Maria Rosa e Gerardo, pela vida, pelos valores e pelo incentivo;

À família, pela ajuda, pelo afeto e apoio em todo momento;

Aos animais, que ao dar a vida permitiram que este estudo fosse possível;

À CAPES e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro;

A todos os que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, assim como no meu aprendizado.

“A educação e o ensino são as mais poderosas armas que podes usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

RESUMO

O diabetes mellitus é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, resultado de defeitos na ação ou secreção da insulina. A complicação mais prevalente do diabetes é a neuropatia diabética periférica que ocasiona alterações sensoriais manifestadas inicialmente por sintomas positivos, tais como dor e alodinia, os quais podem ser seguidos por sintomas negativos, tais como a hipoalgesia e hipoestesia. Existem evidências clínicas de que pacientes com diabetes apresentam maior incidência de dor orofacial. Em adição, em modelos animais de diabetes induzido pela administração única intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), há a descrição do desenvolvimento de hiperalgesia facial ao calor. Os mecanismos relacionados a fisiopatologia desta alteração sensorial, no entanto, ainda não estão totalmente esclarecidos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a contribuição de receptores de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1), principal receptor envolvido na transdução de estímulos térmicos de calor, a nível periférico e central na hiperalgesia térmica em ratos Wistar machos com diabetes induzido por injeção intraperitoneal de STZ (60 mg/kg). Para isto, a hiperalgesia térmica facial foi avaliada antes e semanalmente até a quarta semana após a indução do diabetes. Em ratos diabéticos foi avaliado o efeito do tratamento diário com insulina bem como do tratamento com o antagonista de receptores TRPV1 capsazepina, quando administrado no lábio superior, no gânglio do trigêmeo (TG) ou no subnúcleo *caudalis* (Sp5C) do núcleo sensorial trigeminal na quarta semana após indução do diabetes. Em ratos *naive*, o efeito da capsazepina administrada nos três diferentes sítios descritos acima foi avaliado na hiperalgesia facial térmica induzida pela administração de capsaicina no lábio superior dos animais. Alterações na expressão de receptores TRPV1 periféricos (i.e. nervo infraorbital e TG) e centrais (i.e. Sp5C) foram avaliadas em amostras coletadas quatro semanas após a indução do diabetes. Os resultados mostram que os ratos desenvolvem hiperalgesia facial ao calor desde a primeira até a quarta semana após a injeção de STZ, a qual foi prevenida pelo tratamento diário com insulina. A injeção de capsazepina no lábio superior, TG ou Sp5C resultou em redução significativa da hiperalgesia térmica facial tanto em ratos diabéticos quanto em ratos *naive* que receberam uma injeção prévia de capsaicina no lábio superior. Em conjunto, os resultados sugerem os receptores TRPV1 periféricos e centrais contribuem na hiperalgesia facial ao calor em ratos diabéticos e que a hiperalgesia orofacial ao calor está relacionada ao estado hiperglicêmico.

Palavras-chave: diabetes, dor neuropática, receptor TRPV1, nervo trigêmeo, gânglio do trigêmeo, subnúcleo *caudalis*, capsaicina.

ABSTRACT

Diabetes mellitus represent an heterogeneous group of metabolic disturbs which has in common hyperglycemia, as a result of defects in insulin action or release. The most frequent diabetes complication is diabetic peripheral neuropathy, which leads to sensory alterations manifested by positive symptoms, such as pain and allodynia, which may be followed by negative symptoms, including hypoalgesia and hypoesthesia. There is clinical evidence that diabetic patients present increased incidence of orofacial pain. Additionally, in animal models of diabetes the administration of streptozotocin (STZ) induces facial heat hyperalgesia, but the mechanisms remain to be elucidated. Thus, the use of animal models to investigate peripheral and central mechanisms and changes in the trigeminal system after diabetes induction by STZ is clearly warranted. In the present study, diabetes was induced in male Wistar rats by STZ (60 mg/kg, i.p) and facial heat hyperalgesia was assessed once a week up to four weeks. In diabetic rats, it was assessed the effect of daily insulin treatment and of capsazepine injection into the upper lip, trigeminal ganglion (TG) or subnucleus caudalis (Sp5C) on facial heat hyperalgesia. In naïve rats, the effect of capsazepine injected in the three different sites was assessed in heat hyperalgesia induced by upper lip injection of capsaicin. Changes in peripheral (i.e. infraorbital nerve and TG) and central (i.e Sp5C) TRPV1 expression were evaluated four weeks after diabetes induction. Diabetic rats exhibited facial heat hyperalgesia from the first up to the fourth week after STZ injection, which was prevented by insulin treatment. Capsazepine injection into the upper lip, trigeminal ganglion or medullary subarachnoid space resulted in significant reduction of facial heat hyperalgesia in diabetic rats, as well as capsaicin-treated naïve rats. Compared to naïve rats, diabetic rats exhibited a significant decrease in TRPV1 expression in the infraorbital nerve, but increased expression in the trigeminal ganglion. Conclusion: Our results suggest that peripheral and central TRPV1 receptors participate in facial heat hyperalgesia in diabetic rats, which is related to the hyperglycemic state.

Keywords: diabetes, neuropathic pain, TRPV1 receptores, trigeminal nerve, trigeminal ganglion, subnucleus caudalis, capsaicin.

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

FIGURA 1 -	SISTEMA TRIGEMINAL DE SERES HUMANOS E ROEDORES	23
FIGURA 2 -	ESTRUTURA MOLECULAR DO RECEPTOR TRPV1.....	27
FIGURA 3 -	EFEITO DO TRATAMENTO COM INSULINA NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR STZ	38
FIGURA 4 -	EFEITO DO TRATAMENTO COM INSULINA NOS NÍVEIS DE HbA1c E PESO DE RATOS DIABÉTICOS	39
FIGURA 5 -	EFEITO DE DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR INDUZIDA PELA CAPSAICINA EM ANIMAIS NAIVE	41
FIGURA 6 -	EFEITO DA DEPLEÇÃO DE FIBRAS C NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM ANIMAIS COM DIABETES INDUZIDO POR STZ.....	42
FIGURA 7 -	TESTE DO <i>EYE WIPES</i>	43
FIGURA 8 -	EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO.....	44
FIGURA 9 -	EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM ANIMAIS DIABÉTICOS	46
FIGURA 10 -	NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TRPV1 NO NERVO INFRAORBITAL, NO GÂNGLIO TRIGEMINAL E NO SUBNÚCLEO <i>CAUDALIS</i> EM RATOS APÓS QUATRO SEMANAS DA INDUÇÃO DO DIABETES	47
ESQUEMA 1 -	RESUMO GRÁFICO DAS PRINCIPAIS CONCLUSÕES.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
5-HT	5-hidroxitriptamina
CaM	Calmodulina
CAPS	Capsaicina
CB	Tampão Citrato, do inglês <i>Citrate Buffer</i>
CEUA	Comité de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPZ	Capsazepina
DBT	Diabético
dL	Decilitro
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DND	Dor Neuropática Diabética
DRG	Gânglio da Raiz Dorsal
ECL	Quimioluminescência melhorada, do inglês <i>enhanced chemiluminescenc</i>
EPM	Erro Padrão da Média
g	grama
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HbA1c	Hemoglobina glicada
HPETE	Hidroxiperoxieicosatetraenoico
HRP	Peroxidase de rábano, do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleucina
ION	Nervo infraorbital
LTM	Receptores mecânicos de baixo limiar
mg	Miligrama

NADA	N-araquidonoildopamina
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NDP	Neuropatia Diabética Periférica
ng	Nanograma
NGL	Normoglicêmico
NS	Nociceptivos específicos
OAAM	Metabólitos oxidativos do ácido araquidônico
OLAM	Metabólitos oxidativos do ácido linoleico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonilo
PNDS	Polineuropatía distal simétrica
RTX	Resiniferatoxina
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SO	Ortovanadato de sódio
Sp5C	Núcleo do trato espinhal caudal
STZ	Estreptozotocina
TBS	Solução tamponada de tris
TG	Gânglio do trigêmeo
TNF α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide tipo 1
VEI	Veículo
WDR	Ampla faixa dinâmica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. DIABETES <i>MELLITUS</i>	15
1.1.1. Prevalência	16
1.1.2. Diagnóstico	16
1.1.3. Complicações	17
1.2. DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA	19
1.2.1. Tratamento	20
1.3. DOR OROFACIAL	21
1.4. ESTREPTOZOTOCINA COMO MODELO DE DIABETES	24
1.5. RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE TIPO 1	25
1.5.1. Estrutura molecular	26
1.5.2. Ativação do receptor TRPV1	27
1.5.3. Papel dos receptores TRPV1 na hiperalgesia térmica	29
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVO GERAL	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. MATERIAIS	31
3.1.1. Animais	31
3.1.2. Drogas e soluções	31
3.2. MÉTODOS	32
3.2.1. Indução do diabetes experimental	32
3.2.2. Determinação dos níveis de HbA1c e ganho de peso	32
3.2.3. Microinjeção intraganglionar	33
3.2.4. Extravasamento plasmático	33
3.2.5. Injeção subaracnóidea medular	33
3.2.6. Avaliação da hiperalgesia ao calor	34
3.2.7. Avaliação da expressão de receptores TRPV1	34
3.2.8. Procedimentos experimentais	35
3.2.9. Análise estatística	37

4. RESULTADOS	38
4.1. INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM MODELO DE DIABETES.....	38
4.2. EFEITO DO BLOQUEIO DE RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR INDUZIDA POR CAPSAICINA EM ANIMAIS <i>NAIVE</i>	40
4.3. EFEITO DA DELEÇÃO DAS FIBRAS C NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL APÓS INDUÇÃO DO DIABETES ...	42
4.4. DETERMINAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO APÓS DEPLEÇÃO DAS FIBRAS C EM ANIMAIS <i>NAIVE</i>	44
4.5. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM ANIMAIS DIABÉTICOS	45
4.6. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS DE ANIMAIS <i>NAIVE</i> E DIABÉTICOS ...	47
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é considerado um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos de origem multifatorial que apresenta em comum a hiperglicemia, resultado de defeitos na ação e/ou na secreção de insulina levando a níveis glicêmicos acima dos níveis recomendados e produzindo, em longo prazo, graves problemas sistêmicos (SALGADO, 2007; SBD, 2015; WHO, 2016).

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de DM.

O DM tipo 1 é caracterizado pela deficiência na produção de insulina devido à destruição autoimune/idiopática das células beta-pancreáticas e requer tratamento inicial com insulina (SBD, 2015). Os principais sintomas incluem: poliúria, sede aumentada, fome constante, perda de peso, alterações na visão e fadiga, sendo geralmente diagnosticado nos primeiros anos de vida (WHO, 2016). Cerca de 86.000 pessoas desenvolvem DM1 a cada ano, sendo que a expectativa de vida destas é muito curta (IDF, 2015).

Outros tipos de DM incluem o DM tipo 2, caracterizado por defeitos na ação e secreção da insulina pelo organismo, e que compreende de 90% a 95% dos pacientes com diabetes pelo mundo todo. Está relacionado principalmente a excesso de peso e sedentarismo (SBD, 2015). O DM Gestacional trata-se de qualquer intolerância à glicose com início ou diagnóstico durante a gestação (SBD 2015). Formas menos comuns de DM manifestam-se por defeitos genéticos na função das células beta-pancreáticas ou na ação da insulina, assim como doenças do pâncreas exócrino entre outras condições (SBD, 2015).

1.1.1 Prevalência

O número de indivíduos diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevida de pacientes com DM (SBD, 2015). Segundo a OMS em 2014, 9% dos adultos maiores de 18 anos foram diagnosticados com diabetes e em 2012, o diabetes foi a causa direta de 1,5 milhões de mortes no mundo (WHO, 2016).

Estimou-se que a população mundial com DM atingiu 415 milhões de pessoas em 2015, e deverá atingir 642 milhões em 2040 (IDF, 2015). Aproximadamente 80% das mortes relacionadas a esta doença ocorrem em países de baixa e média renda, sendo que cerca da metade dessas pessoas têm menos de 70 anos (MATHERS e LONCAR, 2006). Além disso, um a cada dois casos de diabetes ainda não é diagnosticado (IDF, 2015).

O Brasil é o quarto país a nível mundial com maior prevalência de DM na população adulta, que está em torno de 14,3 milhões pessoas (IDF 2015). Além disso, é o quinto país com maior despesa em saúde relacionada ao diabetes, sendo que em 2015 cerca de 22 bilhões de dólares americanos foram destinados ao tratamento do DM e suas complicações (IDF 2015).

1.1.2 Diagnóstico

Atualmente, segundo a Sociedade Brasileira do Diabetes são três os critérios válidos para o diagnóstico do diabetes (SBD 2016):

- Glicemia casual acima de 200 mg/dL, acompanhada de sintomas como poliúria, polidipsia e perda de peso. Entende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, sem considerar o horário das refeições.
- Glicemia em jejum \geq 126 mg/dL, confirmado em duas vezes caso o valor seja muito próximo a 126 mg/dL.
- Glicemia 2 horas após sobrecarga oral de 75 g glicose acima de 200 mg/dL.

Em junho de 2010 foi estabelecida pela ADA a utilização da hemoglobina glicada (HbA1c) como parâmetro de referência para avaliar o grau de hiperglicemia crônica entre os pacientes diabéticos (ADA, 2015). A hemoglobina é uma proteína encontrada nas hemácias na qual a glicose se adere formando a chamada hemoglobina glicada (HbA1c). A hiperglicemia contribui para o aumento da ligação e conseqüentemente aumento nos níveis de HbA1c, permanecendo ligada durante os 90 a 120 dias de vida do glóbulo vermelho. A HbA1c é interpretada como uma média da glicose no sangue presente ao longo dos últimos 3-4 meses e sua medição é aceita como índice de glicemia média no tratamento de pacientes com DM. O tratamento do diabetes baseia-se com frequência nos níveis de HbA1c (PEREIRINHA, 2011).

As recomendações atuais são as seguintes:

- Diabetes: HbA1c \geq 6,5% a ser confirmada em outra coleta. Dispensável em caso de sintomas ou glicemia \geq 200 mg/dL
- Indivíduos com alto risco para o desenvolvimento de diabetes: HbA1c entre 5,7 e 6,4%.

1.1.2 Complicações

As pessoas que convivem com DM durante longo período de tempo têm maior risco de sofrer complicações, resultando em altos níveis de morbidade (OECD, 2015) e mortalidade, já que o risco global de morte em pacientes diabéticos é pelo menos o dobro do risco de morte de pacientes não diabéticos (ROGLIC et al., 2005). As complicações do DM afetam tanto indivíduo como seus familiares e a sociedade, gerando grande impacto na vida destas pessoas (SBD, 2015).

O DM aumenta o risco de doenças cardiovasculares (OECD, 2015), assim como aumenta o risco de úlceras, infecções e eventuais amputações dos membros devido à neuropatia (WHO, 2011). Outras complicações do DM são retinopatia e insuficiência renal (WHO, 2012), que são considerados problemas de saúde pública, devido à elevada prevalência da doença na nossa sociedade, gerando um alto impacto social e econômico. O controle glicêmico diminui a probabilidade de complicações, mas a metade da população com

diabetes não mantém valores glicêmicos recomendados (WHO, 2016). A hiperglicemia crônica é o principal fator desencadeador das complicações do DM, sendo comum o desenvolvimento das macroangiopatias, que comprometem as artérias coronarianas, dos membros inferiores e as cerebrais. As microangiopatias afetam a retina ocular, o glomérulo renal e os nervos periféricos.

A complicação mais prevalente do diabetes é a neuropatia diabética periférica (NDP), cuja gravidade aumenta com a evolução temporal da doença. A NDP ocasiona morbidade e mortalidade, piora a qualidade de vida por incapacitação e diminuição de sobrevida (SBD, 2015). A forma mais frequente é a polineuropatia distal simétrica (PNDS), que acomete cerca de 90% dos pacientes e que se define como polineuropatia simétrica motora/sensitiva dependente de comprimento (TESFAYE et al., 2013a). A PNDS afeta nervos periféricos, especialmente pernas e pés (TESFAYE et al., 2010), é caracterizada pela perda progressiva e centrípeta das fibras nervosas motoras e sensoriais (TESFAYE et al., 2013a) e frequentemente manifesta-se como dor neuropática (SUGIMOTO et al., 2000). Estudos demonstram que a hiperglicemia é um fator de risco para NDP (HINDER et al., 2012) mas os mecanismos envolvidos não estão completamente esclarecidos.

Dentre os eventos que ocorrem já está reportada a hiperatividade da via dos poliois, associada à hiperglicemia resultante da falta de insulina ou à sua resistência. Nesta via a enzima aldose redutase catalisa a formação de sorbitol a partir da glicose (reação passo limitante) incluindo a oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) para sua forma oxidada (NADP⁺). Conseqüentemente o sorbitol é oxidado para frutose pela ação da enzima sorbitol desidrogenase, juntamente com a redução de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) para NADH. Está bem esclarecido de que durante o estado hiperglicêmico existe uma maior afinidade da enzima aldose redutase pela glicose, gerando estresse osmótico intracelular pelo acúmulo de sorbitol, uma vez que o mesmo não atravessa a membrana celular (BAYNES e THORPE, 1999; SHEETZ e KING, 2002; OATES, 2008). Entretanto, o aumento na troca dos cofatores NADPH e NAD⁺ é o principal fator

envolvido nas alterações bioquímicas e celulares que contribuem para as alterações do DM, produzindo uma diminuição e regeneração de glutathione, assim como a um aumento de produtos finais de glicação avançada, diacilglicerol e proteína quinase C (PKC). A depleção de glutathione poderia ser a causa primária de estresse oxidativo e estar relacionada com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (OATES, 2008).

O estresse oxidativo também pode ser produzido pela autooxidação da glicose e seus metabólitos, pelo aumento intracelular dos produtos finais de glicação avançada e aumento da expressão/ativação dos seus receptores, alterando a função mitocondrial, ativando a PKC e produzindo uma maior ativação via da hexosamina (BAYNES e THORPE, 1999; BROWNLEE, 2001; GIACCO e BROWNLEE, 2010). Ademais, o estresse oxidativo parece estar relacionado com o aumento da produção de radicais livres resultantes do metabolismo da glicose e espécies reativas de oxigênio (OBROSOVA et al., 2005; DREL et al., 2007; VARENIUK et al., 2007).

Inicialmente os pacientes com NDP, devido aos danos produzidos nos nervos periféricos, apresentam sinais e sintomas positivos tais como dor espontânea ou evocada, que indicam a tentativa de recuperação dos danos produzidos nas fibras (FUCHS et al., 2010). Posteriormente os pacientes deixam de sentir dor e passam a apresentar sinais e sintomas negativos, caracterizados pela perda de sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos, com aumento do risco de lesões e conseqüentemente amputações (YAGIHASHI et al., 2007).

1.2 DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

A dor neuropática diabética (DND) refere-se à dor relacionada com a NDP, e acomete cerca de 30% destes pacientes (TESFAYE e SELVARAJAH, 2012). É considerada a causa de morbidade com maior impacto na capacidade de funcionamento normal, tanto mental quanto físico, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes (HAANPÄÄ, et al., 2013). As principais manifestações clínicas são dormência ou queimação em membros inferiores, formigamento,

pontadas, choques, agulhadas em pernas e pés, desconforto ou dor ao toque de lençóis e cobertores, assim como queixas de diminuição ou perda de sensibilidade tátil, térmica ou dolorosa (SBD, 2015).

A dor pode ser apresentada de forma espontânea ou evocada (SELVARAJAH et al., 2011). A dor evocada manifesta-se geralmente como alodinia ou hiperalgesia. A alodinia caracteriza-se por dor a um estímulo inócuo (SELVARAJAH et al., 2011), enquanto que a hiperalgesia é definida pelo aumento da sensibilidade a estímulos normalmente dolorosos (SUN et al., 2012). A intensidade da dor aumenta progressivamente durante o dia alcançando a intensidade máxima na hora de dormir (HAANPÄÄ, et al., 2013).

Os mecanismos da DND ainda não estão totalmente elucidados, conseqüentemente, o tratamento deste tipo de dor é geralmente insatisfatório (TESFAYE et al., 2013b).

1.2.1 Tratamento

A recomendação internacional para o tratamento da DND baseia-se principalmente em evidências clínicas e indica o uso de antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptção de serotonina-noradrenalina e ligantes $\alpha_2\delta$ dos canais de cálcio dependentes de voltagem como primeira linha de tratamento. Duloxetina e pregabalina são os medicamentos de escolha dentre os inibidores da recaptção de serotonina-noradrenalina e ligantes $\alpha_2\delta$, respectivamente, os quais podem ser associados com analgésicos opioides (TESFAYE e SELVARAJAH, 2012).

Apesar dessas abordagens terapêuticas, um número muito baixo de pacientes apresenta melhora significativa da dor (TESFAYE et al., 2013b; ROSENBERG e WATSON, 2015). O tratamento com duloxetina ou pregabalina produz uma melhora significativa da dor em cerca de 40% destes pacientes (PRITCHETT et al., 2007; WIFFEN et al., 2008).

1.3 DOR OROFACIAL

Evidências clínicas mostram que pacientes diabéticos apresentam maior incidência de dor orofacial (ARAP et al., 2010) e que pessoas com DM vivenciam sensações dolorosas na região orofacial mais intensamente que pessoas não diabéticas com dor orofacial (RAHIM-WILLIAMS et al., 2010). Além disso, estudos pré-clínicos, inclusive do nosso grupo mostraram que os ratos diabéticos apresentam hiperalgesia térmica persistente na região orofacial (RODELLA et al., 2000; NONES et al., 2013; XIE et al., 2015).

A região da cabeça e pescoço está inervada pelo nervo trigêmeo ou V par craniano, que apresenta função principalmente sensitiva e está composto por três ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular (WAITE e ASHWELL, 2004). O ramo oftálmico é unicamente sensitivo e inerva a porção frontal do crânio, órbita ocular, mucosas sinusais e cavidade nasal. O ramo maxilar, também sensitivo, 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 o lábio inferior, bochechas, queixo, arcada dental inferior, gengiva, mucosa do maxilar inferior, assoalho da boca e os dois terços anteriores da língua (WAITE e ASHWELL, 2004). Este último ramo do nervo trigêmeo tem atividade sensitiva e motora, inervando os músculos responsáveis pela mastigação (FRIED et al., 2001).

A morfologia pseudounipolar dos neurônios aferentes primários integrantes do nervo trigêmeo corresponde a um único axônio que se divide em um ramo periférico e um ramo central (THALAKOTI et al., 2007) com os corpos celulares das fibras motoras localizados no tronco cerebral e os corpos celulares da maioria das fibras sensoriais, no gânglio trigeminal (TG) também chamado gânglio semilunar ou gânglio de Gasser (SESSLE, 2000; DAVIES et al., 2010).

Os ramos periféricos do trigêmeo são compostos por três tipos de fibras: A α /A β , A δ e C, que são responsáveis pela detecção de estímulos inócuos ou nocivos. As fibras A α /A β são fibras de grande calibre, altamente mielinizadas, com elevada velocidade de condução (40-120 m/s). As fibras A δ 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). As fibras A β são responsivas a estímulos inócuos ou proprioceptivos, enquanto que as fibras A δ e C (nociceptores) apresentam terminações livres e são responsivas a estímulos nocivos (DUBNER e BENNETT, 1983).

Os neurônios periféricos adentram o tronco cerebral ao nível da ponte, projetando-se para um complexo de núcleos sensoriais do trigêmeo (SESSLE, 2006), subdividido em núcleo sensorial principal, núcleo mesencefálico e núcleo do trato espinhal. O núcleo sensorial principal transmite os impulsos proprioceptivos da cavidade orofacial. No núcleo mesencefálico se localizam os corpos celulares dos neurônios dos ramos motores. Estes neurônios se projetam para o núcleo motor ativando neurônios envolvidos na função do reflexo craniofacial. O núcleo do trato espinhal se subdivide em três subnúcleos: *oralis*, *interpolaris* e *caudalis* (SESSLE, 2000).

O subnúcleo *caudalis*, também chamado corno dorsal bulbar devido à sua semelhança com o corno dorsal da medula espinhal, é uma das estruturas do tronco encefálico de grande importância para o processo nociceptivo orofacial, devido à sua peculiaridade anatômica e neuronal e por apresentar grande concentração de mediadores químicos (como substância P e glutamato) e receptores relacionados com a transmissão nociceptiva, bem como mediadores químicos, como 5-hidroxitriptamina (5-HT), encefalina e ácido gama-aminobutírico (GABA), envolvidos na modulação da dor (SESSLE et al., 2005). Este subnúcleo é o único com divisão laminar, assim como a medula espinhal. Sua principal função é o processamento da maioria das informações nocivas provenientes das regiões orofaciais, que ocorrem nas projeções da maioria das fibras A δ e C, responsáveis pela condução de estímulos nociceptivos (SESSLE, 2000; 2006). Os neurônios aferentes primários fazem sinapse neste nível com os neurônios secundários transmitindo a informação nociceptiva ao tálamo e através de neurônios terciários ao córtex somatossensorial onde será processada (SESSLE, 2000).

Existem diferentes tipos de neurônios de segunda ordem, presentes no núcleo do trato espinhal como os nociceptivos específicos (NS), os de ampla

faixa dinâmica (WDR) e os receptores mecânicos de baixo limiar (LTM). Os primeiros são ativados exclusivamente por estímulos nocivos, ao contrário dos últimos, que respondem somente a estimulação tátil inócua. Entretanto, os neurônios WDR são ativados por estímulos desde inócuos até nocivos (para revisão ver SESSLE et al., 2005). Após serem ativados, os neurônios de segunda ordem transmitem as informações nociceptivas para diferentes regiões do tálamo (SESSLE, 2006). O tálamo é uma das principais estruturas centrais envolvidas na condução dos estímulos nociceptivos, e a partir dele, neurônios de terceira ordem projetam-se para o córtex cerebral resultando no processamento dos aspectos cognitivos e afetivos da dor (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Dada a importância de diminuir o sofrimento e melhorar a qualidade de vida dos pacientes diabéticos torna-se necessária a utilização de modelos animais para o estudo dos mecanismos responsáveis pela instauração da dor crônica induzida pelo diabetes. A organização do sistema sensorial trigeminal é muito semelhante entre seres humanos e roedores (BENOLIEL e ELIAV, 2008; Figura 1), o que permite a utilização de modelos de diabetes em ratos para avaliar o impacto dessa alteração metabólica no processamento nociceptivo trigeminal.

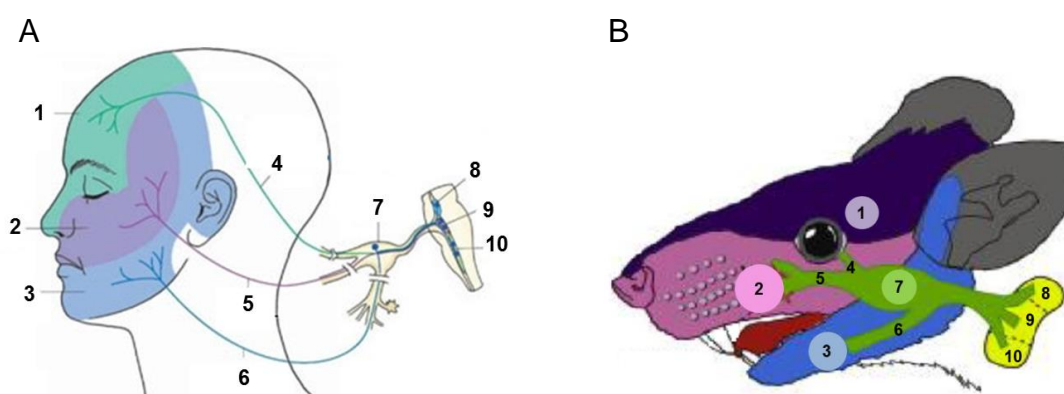


FIGURA 1 - O SISTEMA TRIGEMINAL DE SERES HUMANOS E ROEDORES (1) Divisão oftálmica, (2) Divisão maxilar, (3) Divisão mandibular, (4) Nervo oftálmico, (5) Nervo maxilar, (6) Nervo mandibular, (7) Gânglio trigeminal, (8) Núcleo mesencefálico, (9) Núcleo sensorial principal e (10) Núcleo do trato espinhal. Adaptado de THE CRANIAL NERVES (Organization of the Central Nervous System) PART 3 (A), e (KIM et al., 2014) (B).

1.4 ESTREPTOZOTOCINA COMO MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES

A STZ é a droga clássica utilizada para a indução do diabetes experimental em roedores. A STZ é obtida de colônias de *Streptomyces achromogenes* e inicialmente foi caracterizada como um antimicrobiano de largo espectro (REUSSER, 1971; DELFINO et al., 2002; ALI et al., 2012).

A administração sistêmica de STZ é capaz de induzir diabetes mediante a sua capacidade de destruição das células beta-pancreáticas (DELFINO et al., 2002) e consequente redução do conteúdo de insulina (até 95%) nestas células (JUNOD et al., 1969), mimetizando assim, o quadro de DM tipo 1. A especificidade na lesão das células beta-pancreáticas deve-se à similaridade estrutural entre a STZ e a glicose, permitindo seu transporte para o interior da célula beta-pancreática por moléculas transportadoras específicas de glicose (GLUT2) (DELFINO et al., 2002). É importante ressaltar que estas moléculas GLUT2 também se encontram no fígado e rins, podendo ser responsáveis por efeitos colaterais produzidos pela administração de STZ, como tumores nesses órgãos (ALI et al., 2012).

A injeção sistêmica de STZ produz hiperglicemia persistente em roedores (THULESEN et al., 1997; DELFINO et al., 2002), sendo amplamente utilizada como modelo de diabetes experimental devido a capacidade de reproduzir características do DM como a hiperglicemia, a poliúria (GOYARY e SHARMA, 2010), a redução da velocidade de condução motora e sensorial (KALICHMAN et al., 1998), a hiperalgesia e a alodinia (YAMAMOTO et al., 2009; SUN et al., 2012). Existem evidências que roedores com diabetes induzido por STZ desenvolvem hiperalgesia na pata, a estímulos térmicos (CHRISTOPH et al., 2010; BISHNOI et al., 2011; CASTANY et al., 2016), mecânicos (CUNHA et al., 2009; BISHNOI et al., 2011; CASTANY et al., 2016) e químicos (CUNHA et al., 2009; PABREJA et al., 2011). Entretanto na região orofacial unicamente foi demonstrada hiperalgesia térmica (RODELLA et al., 2000; NONES et al., 2013; XIE et al., 2015), sem alterações no limiar mecânico nem nas respostas induzidas pela formalina (NONES et al., 2013), o que

sugere certas diferenças sensoriais entre o sistema trigeminal e o sistema espinhal.

Com relação à hiperalgesia térmica, o principal transdutor de calor nocivo é o receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) e evidências demonstram sua participação na hiperalgesia ao calor na pata de animais com diabetes induzido por STZ, (PABBIDI et al., 2008b; BISHNOI et al., 2011). O aumento dos níveis de fosforilação, assim como o aumento na expressão destes receptores foi encontrado em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos diabéticos (HONG e WILEY, 2005). Por outro lado, de acordo com alguns autores, a STZ tem uma ação direta em neurônios modulando a expressão do receptor TRPV1, independentemente da sua capacidade de induzir hiperglicemia (PABBIDI et al., 2008a; BISHNOI et al., 2011). A STZ induz aumento na expressão de receptores TRPV1 no DRG e no corno dorsal da medula, e em ambos os locais parece participar no desenvolvimento da hiperalgesia ao calor (PABBIDI et al., 2008a; BISHNOI et al., 2011).

1.5 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE TIPO 1 (TRPV1)

A família de receptores de potencial transitório (TRP) constitui a maior classe de canais iônicos que detectam estímulos nocivos em neurônios. Os membros desta superfamília são canais de cátions não seletivos, permeáveis principalmente ao Ca^{2+} , que atuam como transdutores iniciais de diferentes estímulos nocivos. Os 28 membros desta superfamília estão distribuídos em seis subfamílias em mamíferos: canonical (TRPC), vanilóide (TRPV), anquirina (TRPA), melastatina (TRPM), policistina (TRPP) e mucolipina (TRPML) (VENKATACHALAM e MONTELL, 2007; LOESER e TREEDE, 2008). A participação dos canais TRP na dor e na inflamação neurogênica está bem estabelecida (BEVAN e ANDERSSON, 2009; STUCKY et al., 2009; FERNANDES et al., 2011), e inúmeros estudos mostram que esses canais participam da transmissão nervosa sensorial, tanto a nível central como periférico (FERNANDES et al., 2012).

O receptor TRPV1 é um canal catiônico não-seletivo ativado por ligante com uma permeabilidade nove vezes superior para íons Ca^{2+} em relação aos íons Na^+ (TOMINAGA et al., 1998; HOLZER, 2008). É um integrador de uma grande variedade de estímulos físicos e químicos exógenos e endógenos, incluindo a capsaicina, calor nocivo ($>43^{\circ}\text{C}$), e prótons ($\text{pH}<6,5$) (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998). Assim, o mesmo participa no desenvolvimento da sensação de ardência e/ou dor associada com a exposição aguda ao calor ou à capsaicina, e com a inflamação em tecidos periféricos (CATERINA et al., 1997; JUNG et al., 2004). Além disso, tem um importante papel em algumas condições de dor crônica como dor neuropática, osteoartrite, câncer, doença inflamatória intestinal e enxaqueca (SZALLASI et al., 2007; DUX et al., 2012). Seu papel no sistema nervoso central (SNC) é conhecido por envolver processamento e modulação da dor, neurogênese (JIN et al., 2004) e termorregulação (JANCSO-GABOR et al., 1970; ALAWI et al., 2015).

1.5.1 Estrutura molecular

A clonagem do TRPV1 permitiu determinar sua estrutura molecular e entender a nível molecular como os neurônios sensitivos detectam as alterações na temperatura (CATERINA et al., 1997; CLAPHAM et al., 2001; MONTELL, 2001; VENKATACHALAM e MONTELL, 2007). Como ilustrado na figura 2, o receptor TRPV1, é um canal iônico de membrana plasmática, formado pela união de quatro subunidades que formam um poro central (KEDEI et al., 2001; HOENDEROP et al., 2003). Cada uma das subunidades contém seis domínios transmembranas e dois terminais citosólicos em cada extremidade da molécula. O amino-terminal apresenta domínios anquirina os quais contribuem para a função do canal (JUNG et al., 2002) e estão envolvidos nas interações entre as proteínas do receptor com as proteínas intracelulares, modulando assim, as funções das mesmas (MORENILLA-PALAO et al., 2004). O receptor também exibe o domínio carboxila-terminal que contém fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), domínios de ligação a calmodulina (CaM) e um domínio TRP (RAMSEY et al., 2006), importante para

a tetramerização das subunidades, detecção de temperatura e modulação da abertura do canal (CLAPHAM, 2003; VLACHOVA et al., 2003; GARCIA-SANZ et al., 2004; BRAUCHI et al., 2006; GARCIA-SANZ et al., 2007). O domínio TRP no TRPV1 serve como determinante molecular da tetramerização da subunidade para formar um canal funcional (GARCIA-SANZ et al., 2004). Um segmento (6-mer) no núcleo do domínio TRP, referido como a caixa TRP, é altamente conservado entre a família de canais TRP e tem sido implicado no acoplamento alostérico de sensores de estímulos e a abertura do poro (VALENTE et al., 2008). O poro do canal situa-se entre os domínios cinco e seis, e quando aberto permite a entrada não seletiva de cátions, principalmente Ca^{2+} e em menor proporção Na^+ (CATERINA et al., 1997; MONTELL, 2005; RAMSEY et al., 2006).

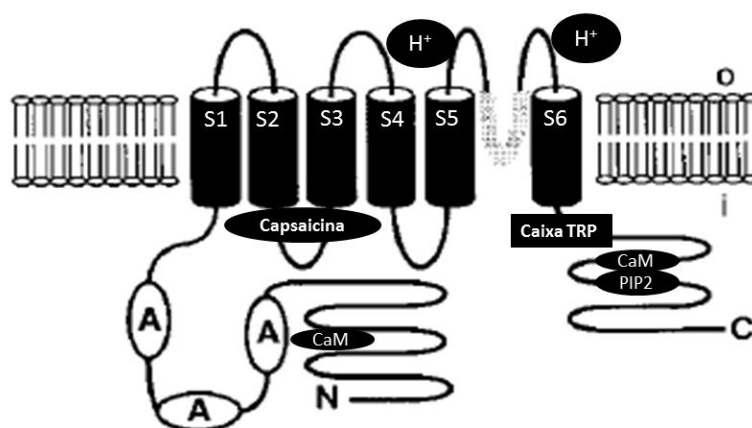


FIGURA 2 - ESTRUTURA MOLECULAR DO RECEPTOR TRPV1.

Caracteriza-se pela presença de 6 domínios transmembrana, entre o S5 e o S6 forma-se o poro do canal, e possui domínios carboxila- e amino-terminais intracelulares em cada extremidade da molécula. Na figura estão representados os sítios de ligação para capsaicina e de ativação por prótons (H^+). Na região N-terminal contém domínios de anquirina (A), e na região C-terminal apresenta sítios de ligação para calmodulina (CaM) e fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), assim como o domínio tipo TRP, uma região no C-terminal adjacente ao portão interno do receptor que é essencial para a tetramerização das subunidades e a abertura do canal (Caixa TRP). Adaptado de CATERINA et al., 1997.

1.5.2 Ativação do receptor TRPV1

Os agonistas endógenos dos receptores TRPV1 incluem os endovanilóides como a anandamida, que também ativa receptores cannabinoídes (ZYGUMUNT et al., 1999), a N-araquidonoildopamina (NADA) (HARRISON et al., 2003) ou os produtos derivados da lipoxigenase (HWANG et al., 2000), principalmente o ácido hidroxiperoxi-eicosatetraenóico (12-

HPETE). Também pode ser ativado endogenamente por calor nocivo (>43°C) e acidose (pH<6,5) (STAROWICZ et al., 2007), assim como por moléculas exógenas como a capsaína e resiniferatoxina (TOMINAGA e TOMINAGA, 2005). Recentemente, tem sido demonstrado que determinados componentes presentes em substâncias naturais como a cânfora (XU et al., 2005) e a alicina (MACPHERSON et al., 2005) também ativam os receptores TRPV1, assim como o óxido nítrico (YOSHIDA et al., 2006) ou peptídeos provenientes do veneno de tarântula (SIEMENS et al., 2006). Assim como foi visto que processos inflamatórios induzem o aumento de agonistas endógenos de TRPV1 como os metabólitos oxidativos do ácido linoleico (OLAMs) e do ácido araquidônico (OAAMs), principalmente pela oxidação de ácidos graxos ômega-6 (HARGREAVES e RUPAREL, 2016). Ademais, determinados cátions extracelulares podem modular sua atividade (AHERN et al., 2005).

A capsaicina é uma substância que se encontra nas plantas do gênero *Capsicum* (pimenta vermelha), capaz de ativar seletivamente o receptor TRPV1, motivo pelo qual se associa ao nome do receptor. A resiniferatoxina (RTX) é um análogo da capsaicina, isolada da planta *Euphorbia resinífera*, que inicialmente foi caracterizada esperando ter uma atividade promotora de tumor, mas estudos comprovaram ter uma relação estrutura-atividade semelhante à capsaicina (SZALLASI e BLUMBERG, 1990). Assim como a capsaicina, a RTX apresenta um grupamento homovanílico que permite sua ligação específica no receptor TRPV1 entre os domínios 2 e 3 intracelularmente, porém a capsaicina apresenta uma conformação de amina, enquanto que a RTX de éster (SZALLASI e BLUMBERG, 1990). Devido a essas semelhanças estruturais ambas apresentam praticamente os mesmos efeitos. Entretanto a RTX tem um efeito agonista TRPV1 dez vezes mais potente, o que faz desta molécula uma ferramenta útil no estudo farmacológico da ativação do TRPV1 (MAGGI et al., 1990; SZALLASI, 1994).

1.5.3 Papel dos receptores TRPV1 na hiperalgesia térmica

Existem inúmeras evidências de que receptores TRPV1 presentes nas terminações nervosas periféricas dos neurônios sensoriais contribuem para a hiperalgesia térmica em modelos experimentais de dor (JI et al., 2002; CHRISTOPH et al., 2006; KANAI et al., 2007; MALEK et al., 2015; SALAT e FILIPEK, 2015). Alguns estudos também demonstraram a contribuição de receptores TRPV1 periféricos na hiperalgesia térmica em modelo de diabetes induzida por STZ em ratos (HONG e WILEY, 2005; PABBIDI et al., 2008b; BISHNOI et al., 2011).

Além disso, os receptores TRPV1 também são encontrados em projeções centrais de neurônios sensoriais da medula espinhal, onde parecem facilitar a transmissão nociceptiva para neurônios de segunda ordem (SPICAROVA e PALECEK, 2008) e sugere-se que sua expressão aumentada na medula espinhal contribua para a sensibilização central em modelo de dor neuropática diabética induzida por STZ (BISHNOI et al., 2011).

Os receptores TRPV1 também estão presentes no sistema trigeminal, inclusive nos ramos periféricos, TG e Sp5C de roedores (BAE et al., 2004; KARAI et al., 2004; ROBERTS et al., 2004; HAN et al., 2009; CHICHORRO et al., 2010; PARK, 2015). Recentemente, a expressão dos mesmos foi caracterizada no sistema trigeminal humano, principalmente em neurônios de pequeno e médio diâmetro do TG e na lamina superficial do Sp5C (QUARTU et al., 2016). Além disso, alguns estudos reportaram a participação dos receptores TRPV1 em diferentes modelos de dor orofacial. A maior parte desses estudos mostrou um aumento na expressão dos receptores TRPV1 em neurônios do TG relacionadas com o desenvolvimento de alterações sensoriais na face (BIGGS et al., 2007; KIM et al., 2008; CHUNG et al., 2011; QIAO et al., 2015; URATA et al., 2015; GAO et al., 2016).

Apesar destas evidências, a participação assim como as alterações na expressão dos receptores TRPV1 na hiperalgesia térmica orofacial no modelo experimental da STZ ainda não foram investigadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a correlação da hiperglicemia com o desenvolvimento da hiperalgesia orofacial ao calor e a contribuição de receptores TRPV1 periféricos e centrais para o desenvolvimento da hiperalgesia orofacial ao calor em modelo de diabetes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a correlação do desenvolvimento da hiperalgesia térmica orofacial com a glicemia no modelo de diabetes induzido por STZ;
- Determinar as doses de antagonista necessárias para bloquear os receptores TRPV1 em animais *naive* para utilização do mesmo protocolo em animais diabéticos.
- Investigar a contribuição de receptores TRPV1 presentes nas terminações periféricas dos neurônios sensoriais para a hiperalgesia orofacial ao calor em animais diabéticos;
- Investigar a contribuição dos receptores TRPV1 presentes no gânglio do trigêmeo para a hiperalgesia térmica orofacial em animais diabéticos;
- Investigar o papel dos receptores TRPV1 centrais, expressos no subnúcleo caudalis, na hiperalgesia térmica orofacial em animais diabéticos;
- Avaliar alterações na expressão de receptores TRPV1 em neurônios sensoriais periféricos, no gânglio do trigêmeo e subnúcleo *caudalis* em animais diabéticos comparados com animais *naive*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1. Animais

Para este estudo foram utilizados ratos *Rattus norvegicus* variedade Wistar machos, pesando entre 180 g e 220 g provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os experimentos começaram após dois dias de previa ambientação dos animais no biotério do laboratório.

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (entre 21 ± 1 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água, sendo que os ratos diabéticos tiveram a maravalha trocada todos os dias e foram mantidos em número máximo de quatro animais por caixa.

Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comité de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR; aprovação nº 916) e estão de acordo com as diretrizes Brasileiras do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

3.1.2. Drogas e soluções

Para indução do diabetes experimental foi utilizada STZ (administrada por via i.p. na dose de 60 mg/Kg), adquirida da Santa Cruz Biotechnology, dissolvida em tampão citrato de sódio (CB) adquirido da Sigma-Aldrich e preparado em solução de 10 mM e pH 4,5. Como antagonista do receptor TRPV1 foi utilizado capsazepina (CPZ), adquirida da Sigma-Aldrich, USA e dissolvida em etanol absoluto e subsequentemente em salina, nas concentrações de 30 µg/50 µL para administração no lábio e de 10 µg/10 µL para administração no TG e no Sp5C. Os agonistas TRPV1 utilizados foram capsaicina (CAPS - 3 µg/50 µL; administrada no lábio superior) obtida da Sigma-Aldrich, USA, sendo reconstituída em 10% de Tween 80 e 10% de

etanol em salina, e resiniferatoxina (RTX - 200 ng/10 μ L; intraganglionar) obtida da Sigma-Aldrich, USA e diluída em uma solução de 1% de etanol em salina. Os protocolos experimentais e as doses utilizadas foram baseados em estudos prévios e experimentos piloto em nosso laboratório (NEUBERT et al., 2005; GARCIA et al., 2009; KOPRUSZINSKI et al., 2015).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Indução do diabetes experimental

A indução do diabetes foi realizada mediante uma injeção única i.p. de STZ (60 mg/Kg) em ratos submetidos previamente a jejum de 12 horas e que prolongou-se mais 2 horas após a injeção para otimizar o efeito farmacológico da STZ. O estado hiperglicêmico dos animais foi confirmado após 72 horas, por meio de amostras de aproximadamente 5 μ L de sangue da veia caudal. A gota de sangue foi colocada em fitas teste impregnadas de glicose oxidase (Accu-Check ActiveTM, Roche) e inseridas em glicosímetro. O animal foi considerado diabético e mantido no estudo quando a glicemia foi igual ou superior a 250 mg/dL, inclusive no final do experimento. Todos os animais foram pesados antes do tratamento e semanalmente até o término dos experimentos a fim de avaliar as diferenças no ganho de peso entre os animais dos grupos normoglicêmico e diabético.

3.2.2 Determinação dos níveis de HbA1c e ganho de peso

Após administração da STZ ou CB os animais foram tratados diariamente com insulina NPH (6 UI/dia) ou veículo, e pesados semanalmente para determinar o ganho de peso. Após quatro semanas da indução do diabetes, os animais diabéticos e normoglicêmicos foram decapitados sob anestesia inalatória (halotano 4%) e coletado o sangue total para determinação dos níveis de HbA1c plasmática. A quantificação dos níveis de HbA1c plasmática foi determinada utilizando o teste Glicohemoglobina HbA1 ao final do experimento, realizado no laboratório do hospital veterinário da UFPR.

3.2.3 Microinjeção intraganglionar

A injeção direta no TG foi realizada seguindo procedimentos previamente definidos por NEUBERT et al., (2005) com algumas modificações e após treinamento com corante para identificar o local injetado. Cada animal foi previamente anestesiado (halotano 4% por via inalatória) e rapidamente uma agulha gengival longa (27-gauge 0,4 x 30 mm; Injex®) conectada por um cateter a uma seringa Hamilton foi posicionada em um ângulo de cerca de 10° da linha média da cabeça do rato. A agulha foi introduzida através do forame infraorbital em direção ao forame rotundo até que a contração do músculo masseter ipsilateral fosse percebida. Após injeção do volume de 10 µL tanto para administração de CPZ como de RTX, ou seus respectivos veículos, a agulha foi suavemente removida. Os animais foram monitorados por cerca de um minuto, até sua recuperação da anestesia, e por mais alguns minutos para avaliação de possíveis danos teciduais na pele ao redor do sítio de injeção. Foi realizada eutanásia imediata (com halotano por via inalatória) dos animais que apresentaram lesões cutâneas no local de injeção ou próximo a ele.

3.2.4 Extravasamento plasmático

Após 2 dias da depleção de fibras C mediante a administração de RTX no TG (200 ng/10 µL), conforme descrito no item anterior, foi realizado o extravasamento plasmático para confirmar a injeção intraganglionar, seguindo o protocolo descrito por KARAI e colaboradores (2004). Os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina e cetamina (10 e 90 mg/Kg respectivamente) por via intraperitoneal e seguidamente foi administrada uma solução de azul de Evans (30 mg/Kg) na veia peniana. Posteriormente, os mesmos receberam 400 µL de uma solução de capsaicina (5% em acetona) na face e após 15 minutos foi coletada a pele do lado direito e esquerdo da face para análise quantitativa de absorbância.

3.2.5 Injeção subaracnóidea medular

Para bloqueio dos receptores TRPV1 centrais foi seguido o procedimento de FISCHER et al. (2005) após treinamento com corante para identificar o local injetado. Inicialmente, a região da injeção foi tricotomizada e após anestesia por via inalatória (halotano 4%), uma agulha hipodérmica

conectada por um cateter a uma seringa Hamilton foi introduzida em cada animal entre o osso occipital e a C1 e levemente inclinada na direção do crânio. Após administração do antagonista TRPV1 a agulha foi lentamente removida e os animais foram monitorados por cerca de um minuto, até sua recuperação da anestesia, e por mais alguns minutos para avaliação de alterações comportamentais imediatas. Os animais com comprometimento motor foram descartados dos experimentos.

3.2.6 Avaliação da hiperalgesia ao calor

Os animais foram contidos pela mão do experimentador e com a outra mão foi posicionada uma fonte de calor de aproximadamente 50°C a cerca de 1 cm da área de inserção das vibrissas, do lado direito da face. Em seguida, foi registrado o tempo para que cada animal exibisse reações de afastar vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentar movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (CHICHORRO et al., 2009). Foi estipulado um tempo de corte de 20 segundos para evitar danos teciduais.

3.2.7 Avaliação da expressão de receptores TRPV1

Ratos diabéticos de quatro semanas e ratos *naive* foram decapitados sob anestesia inalatória profunda (halotano 4%) para retirada da porção periférica final do nervo infraorbital (ION), do TG e do Sp5C e determinação os níveis de expressão dos receptores TRPV1 por *Western Blot*. As amostras foram coletadas após confirmação do desenvolvimento de hiperalgesia térmica nos animais diabéticos, congeladas em gelo seco e armazenadas em freezer -70°C. As amostras mantidas em gelo foram homogenizadas durante 2 minutos em tampão RIPA contendo fenilmetanosulfonilfluoride (PMSF; 2 mM), ortovanadato de sódio (SO; 1 mM) e um coquetel de inibidores de proteases (1:100; Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Em seguida, os tecidos foram centrifugados durante 6 minutos a 12.000 rpm e 4 °C e a fração sobranadante foi utilizada para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Foram utilizados 30 µg de proteína adicionadas ao tampão Laemmli durante 10 minutos. A separação por eletroforese foi realizada em géis de acrilamida a 12%. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por eletroforese

utilizando corrente contínua de 300 mA durante 120 minutos. Posteriormente a membrana foi incubada com TBS (0,1%)- Tween 20 (TBST, pH 7.4) contendo leite desnatado (5%), durante uma hora para bloquear os sítios de ligação inespecífica, e em seguida foram lavadas cinco vezes durante 5 minutos com 10 mL de TBST. Posteriormente as membranas foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário de coelho anti- TRPV1 (Sigma, St. Louis, MO). O anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com HRP) foi diluído em tampão TBST contendo 5% de leite desnatado, no qual a membrana foi incubada durante 1 hora sob agitação. As bandas foram visualizadas por aumento da quimioluminescência, utilizando o sistema de detecção ECL (General Electric) e expostas a filme de raio x para revelação (Kodak, Rochester, NY). O anticorpo anti- α -tubulina (Millipore, Billerica, MA) foi utilizado como controle. A quantificação da intensidade dos sinais das bandas foi determinada por densitometria utilizando o software Image J (National Institute of Health, USA), considerando o extrato total de proteína (Adaptado de CHICHORRO, 2006).

3.2.8. Procedimentos experimentais

Avaliação do tempo de hiperglicemia no desenvolvimento da hiperalgesia facial ao calor em modelo de diabetes

Para a avaliação da influência do tempo de hiperglicemia no desenvolvimento da hiperalgesia facial ao calor, um grupo de animais diabéticos e um grupo de animais normoglicêmicos foram tratados com insulina por um período de quatro semanas, com uma dose diária de 6 UI de insulina regular (NPH) pela via subcutânea (s.c.), dividida em duas aplicações, sendo a primeira de 2 UI entre às 9 e 10 h e a segunda de 4 UI entre às 16 e 17 horas, prevendo maior atividade noturna dos roedores. Os grupos de animais normoglicêmicos e diabéticos controle foram tratados com veículo (solução salina) na mesma frequência e período de duração do tratamento com insulina. O efeito do tratamento com insulina na latência de resposta ao estímulo térmico foi avaliado semanalmente durante quatro semanas (conforme descrito no item 3.2.5). Este protocolo foi adaptado de RODELLA et al., 2000.

Avaliação do efeito do bloqueio de receptores TRPV1 periféricos e centrais na hiperalgesia térmica orofacial induzida por capsaicina em animais naïve.

Após avaliação da latência basal de resposta ao estímulo térmico, em um grupo de animais foi administrada CPZ (30 µg/50 µL) no lábio superior direito 30 minutos antes da injeção de capsaicina (3 µg/50 µL, s.c.) no mesmo sítio. Em um grupo independente de animais *naïve*, após avaliação da latência basal de resposta ao estímulo térmico, a CPZ (10 µg/10 µL) foi administrada no TG 30 minutos antes da injeção de capsaicina (3 µg/50 µL, s.c.) no lábio superior ipsilateral. A avaliação do efeito do bloqueio de receptores TRPV1 centrais foi realizada mediante administração de CPZ (10 µg/10 µL) no subnúcleo *caudalis* 30 minutos antes da injeção de capsaicina (3 µg/50 µL, s.c.) no lábio superior ipsilateral.

Nos três protocolos, a hiperalgesia ao calor foi avaliada como descrito no item 3.2.5, utilizando as doses descritas em protocolos anteriores (NEUBERT et al., 2005; GARCIA et al., 2009; KOPRUSZINSKI et al., 2015) em intervalos de 1 hora até a 4ª hora após a administração de capsaicina.

A realização destes experimentos permitiram determinar as doses dos antagonistas, bem como sua eficácia no bloqueio da hiperalgesia térmica induzida por capsaicina quando administrados em diferentes estruturas do sistema trigeminal.

Efeito da depleção das fibras C no desenvolvimento da hiperalgesia térmica orofacial após indução do diabetes

Após determinação da latência basal de resposta ao calor, os animais foram anestesiados e recebem uma injeção intraganglionar (descrita no item 3.2.3) de RTX (200 ng/10 µL). A depleção das fibras C pela RTX foi confirmada após 72 horas mediante o teste do *Eye Wipes*. Esse teste consiste na aplicação, com o auxílio de uma pipeta, de 20 µL de uma solução de capsaicina a 0,01% no olho ipsilateral à injeção. Imediatamente após a aplicação, os animais foram colocados em caixas de acrílico transparentes e observados durante dois minutos para registro do número de vezes que executaram movimento de limpeza dos olhos. Foram incluídos no experimento

somente os animais que realizaram número de *eye wipes* igual ou inferior a 5 após tratamento com RTX (ROGERIO et al., 2011). A indução do diabetes foi realizada 48 horas após o teste do *eye wipes*. Os níveis glicêmicos dos animais foram determinados 72 horas após a administração da STZ, enquanto que a hiperalgesia ao calor foi avaliada semanalmente até a quarta semana. Ao final do experimento (i.e após a quarta semana) tanto a glicemia quanto o teste do *eye wipes* foram repetidos nos mesmos animais.

Contribuição dos receptores TRPV1 periféricos e centrais na hiperalgesia orofacial ao calor em animais diabéticos.

Nesse conjunto de experimentos, a resposta dos animais ao calor foi determinada previamente e na quarta semana após indução do diabetes, conforme descrito no item 3.2.5. Em seguida, grupos independentes de animais normoglicêmicos ou diabéticos foram tratados com CPZ no lábio superior, TG ou Sp5C, conforme descrito nos item 3.2.3 e 3.2.4. Grupos de animais normoglicêmicos ou diabéticos controle receberam o veículo correspondente nos três diferentes sítios de injeção (i.e lábio superior, TG ou Sp5C). O efeito dos tratamentos na hiperalgesia ao calor foi avaliado 30 minutos após a injeção e em intervalos de 1 hora, durante 6 horas.

3.2.9 Análise estatística

Os dados obtidos nos testes comportamentais para avaliação da hiperalgesia térmica orofacial ao calor foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguida do teste de Tukey ou Bonferroni. Na análise densitométrica das bandas de *Western Blot*, foi utilizado Teste t não pareado. Os dados foram apresentados como média \pm EPM e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM MODELO DE DIABETES.

Os animais diabéticos tratados com veículo apresentaram uma diminuição na latência de resposta ao calor a partir da primeira semana após administração da STZ que se manteve até a quarta semana. Por outro lado, os animais normoglicêmicos tratados com insulina não apresentaram variações significativas na latência de resposta ao longo das 4 semanas de avaliação. O tratamento diário dos animais diabéticos com insulina preveniu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica, mas não alterou a latência para resposta dos animais normoglicêmicos (Figura 3).

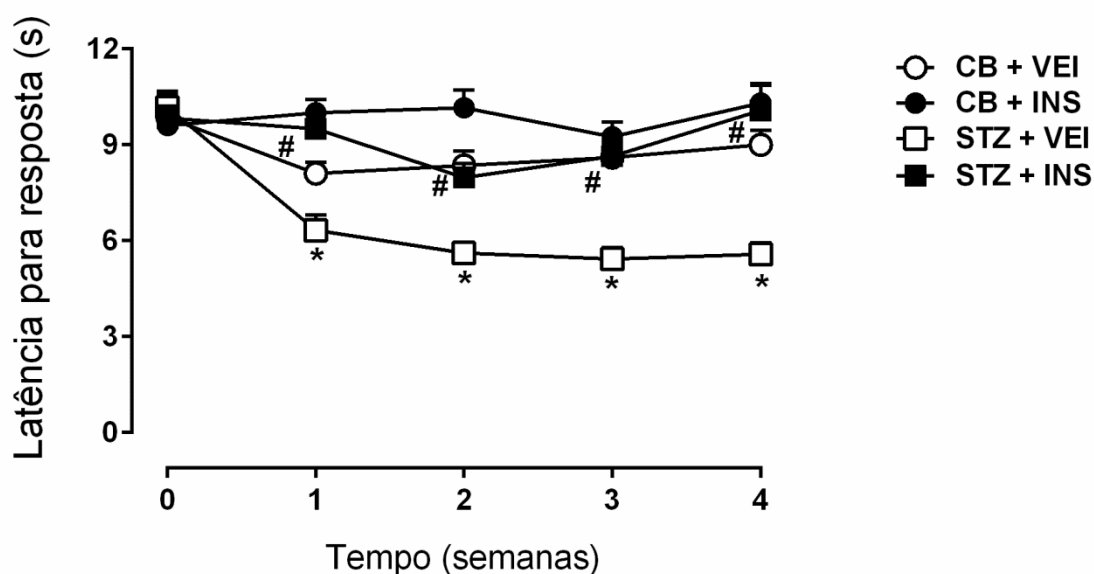


FIGURA 3 - EFEITO DO TRATAMENTO COM INSULINA NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR STZ.

Decurso temporal da hiperalgesia ao calor em animais diabéticos comparado com animais normoglicêmicos tratados com insulina ou veículo. Os valores representam a média \pm EPM (n=10-15) * $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo CB+VEI e # $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo STZ-VEI (ANOVA de duas vias seguido do teste post-hoc de Tukey).

A determinação dos níveis de HbA1c no final do experimento demonstrou que os ratos com diabetes induzido por STZ apresentaram níveis significativamente superiores do que os ratos controle (Fig 4A). Também demonstrou que o tratamento com insulina nos animais tratados com CB não alterou os níveis de HbA1c. Por outro lado, o tratamento com insulina diminuiu significativamente os níveis de HbA1c nos ratos diabéticos, os quais mostraram-se muito semelhantes aos níveis dos animais normoglicêmicos (Fig 4A). Contrariamente, o tratamento com insulina não alterou significativamente o peso corporal entre os diferentes grupos de ratos diabéticos ou normoglicêmicos tratados com insulina ou veiculo (Fig 4B).

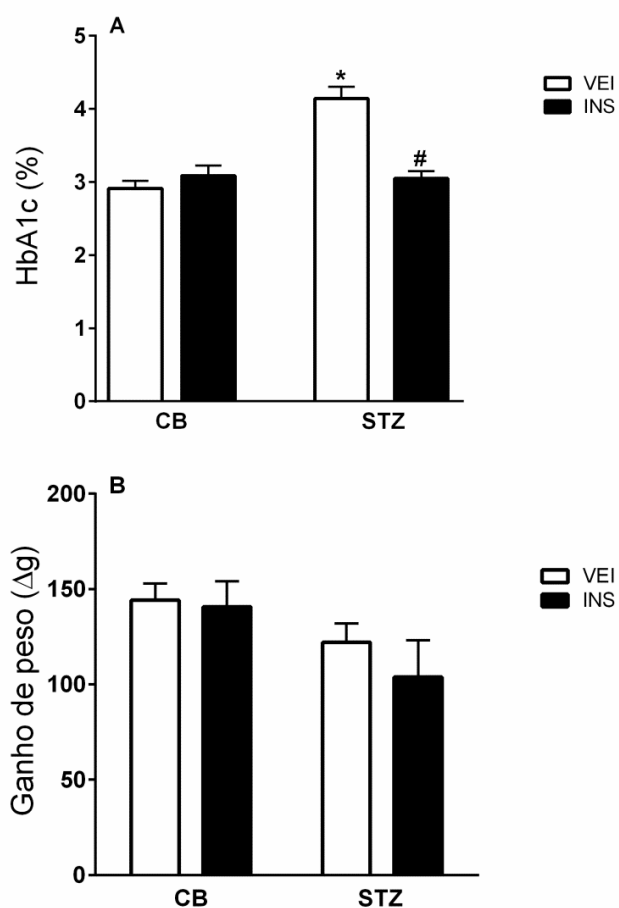


FIGURA 4 : EFEITO DO TRATAMENTO COM INSULINA NOS NÍVEIS DE HbA1c E PESO DE RATOS DIABÉTICOS

Níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) quatro semanas após a diabetização (painel A). Efeito do tratamento com insulina no peso dos animais (painel B). Os valores representam a média \pm EPM ($n=10-15$) * $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo CB+VEI e # $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo STZ-VEI (ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc Tukey, painel A; teste t de *Student*, painel B).

4.2 EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR INDUZIDA POR CAPSAICINA EM ANIMAIS NAIVE.

A injeção de capsaicina no lábio superior direito induziu hiperalgesia facial ao calor em animais *naïve* a partir dos 30 minutos após administração, a qual persistiu até a terceira hora em comparação com o grupo controle (Fig 5A). O pré-tratamento com CPZ no lábio superior direito preveniu o desenvolvimento da hiperalgesia (Fig 5A).

Em outro grupo de animais, o tratamento com CPZ no TG impediu o desenvolvimento da hiperalgesia durante duas horas após administração de capsaicina no lábio superior direito dos animais *naïve* (Fig 5B).

No último grupo de animais *naïve*, o tratamento com CPZ através de injeção subaracnóidea medular reverteu a hiperalgesia facial ao calor por uma hora após administração de capsaicina no lábio superior direito (Fig 5C).

Em todos os experimentos, a administração de CPZ previamente à administração de veículo no lábio superior não induziu alterações significativas na latência de resposta dos animais (Fig 5A, B e C).

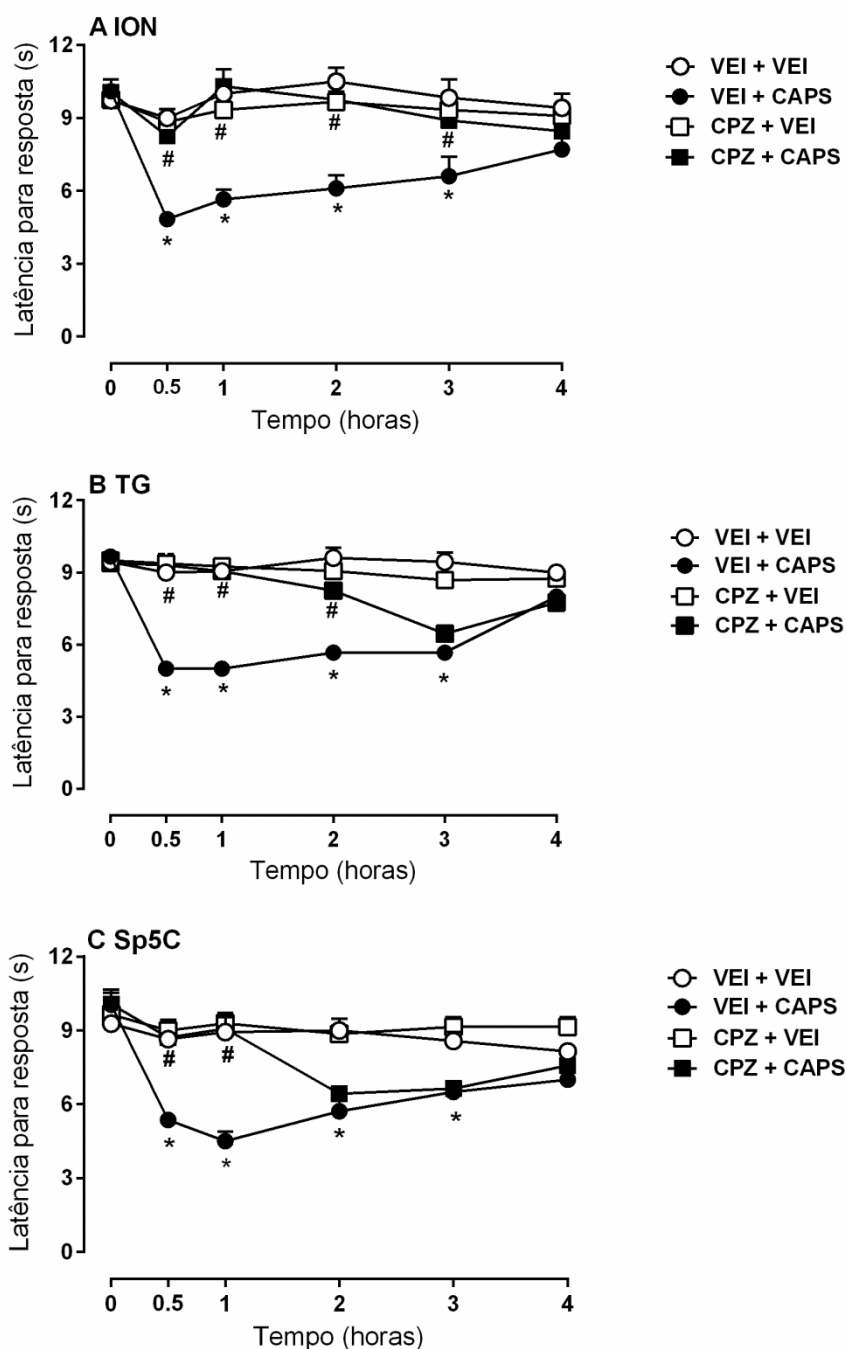


FIGURA 5 - EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR INDUZIDA POR CAPSAICINA EM ANIMAIS NAIVE.

Os animais foram tratados com capsazepina (CPZ) no lábio superior por via s.c. (ION; 30 μ g/50 μ L; painel A), no gânglio do trigêmeo (TG; 10 μ g/10 μ L; painel B) e no espaço subaracnóideo medular (Sp5C; 10 μ g/10 μ L; painel C), 30 min antes da administração de capsaicina (CAPS, 3 μ g/50 μ L, s.c.) ou veículo (VEI, 50 μ L) no lábio superior. Animais do grupo controle foram tratados com veículo (VEI), no volume correspondente para cada via. A latência de resposta ao calor foi avaliada antes (tempo 0) e 0,5 a 4 horas após a administração da CAPS. Os valores representam a média \pm EPM (n=6-10) * $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo VEI+VEI e # $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo VEI+CAPS (ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Tukey).

4.3 EFEITO DA DELEÇÃO DAS FIBRAS C NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL APÓS INDUÇÃO DO DIABETES

A administração intraganglionar de veículo não alterou o padrão de reposta dos animais diabéticos e normoglicêmicos ao longo das quatro semanas (Fig 6). A administração intraganglionar de RTX previamente à diabetização preveniu o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor nos animais diabéticos, mas não alterou a latência de resposta dos animais normoglicêmicos (Fig 6).

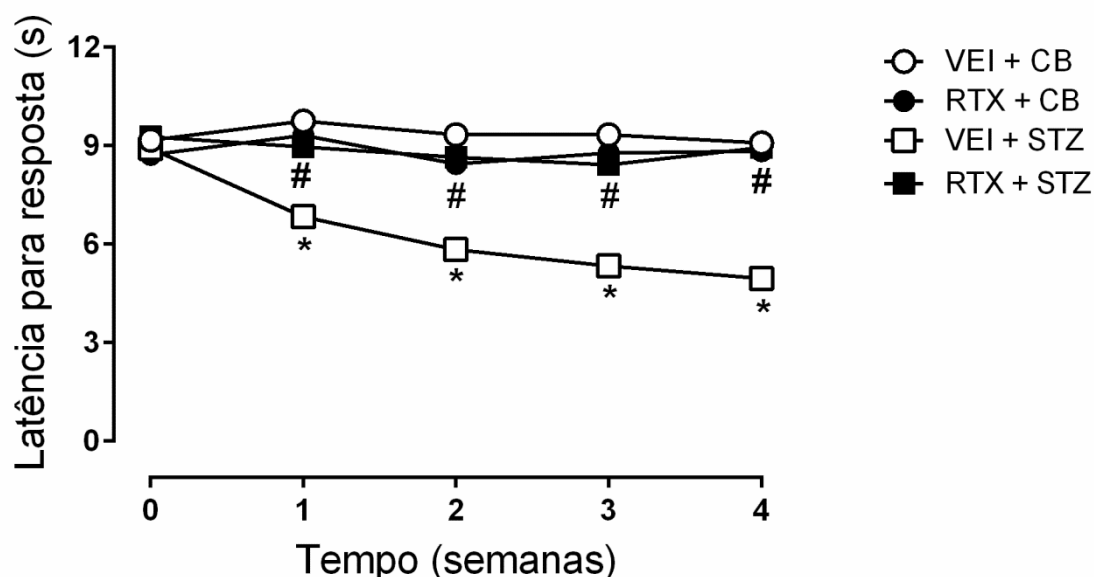


FIGURA 6 - EFEITO DA DEPLEÇÃO DE FIBRAS C NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM ANIMAIS COM DIABETES INDUZIDO POR STZ.

Após determinação da latência basal de resposta ao calor (tempo 0), os animais receberam uma injeção intraganglionar de veículo (VEI, 10 μ L) ou RTX (200 ng/10 μ L). Cinco dias após a injeção intraganglionar os animais foram tratados com estreptozotocina (STZ, 60 mg/Kg) ou veículo (CB, 10 Mm, pH 4,5, 1 mL/Kg) e a hiperalgesia ao calor foi avaliada previamente ao tratamento com RTX ou VEI (0) e semanalmente até a quarta semana após a diabetização. Os valores representam a média \pm EPM (n=6-14). * $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo VEI+CB e # $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo VEI+STZ (ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Tukey).

A deleção das fibras C pela administração intraganglionar de RTX foi confirmada com o teste de *Eye Wipes* realizado 48 horas após a administração de RTX (Fig 7A) e repetido quatro semanas após a diabetização (Fig 7B).

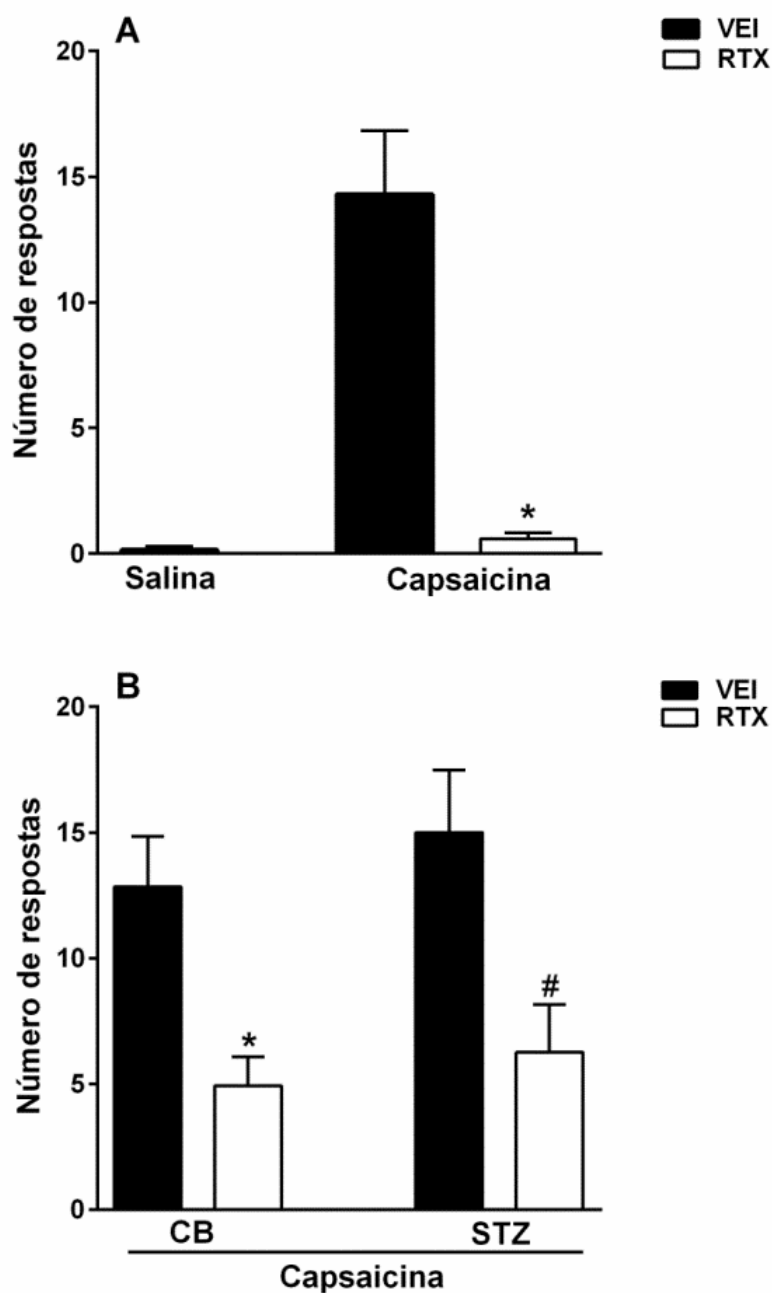


FIGURA 7– TESTE DO *EYE WIPES*

A confirmação da deleção das fibras C após o tratamento com resiniferatoxina (RTX - 200 ng/10 μ L) ou veículo (VEI) por via intranganglionar foi realizado aplicando uma solução de capsaicina na córnea ipsilateral a injeção dos animais (0,01%, 20 μ L) ou salina (20 μ L) antes (painel A) e quatro semanas após (painel B) o tratamento com estreptozotocina (STZ) ou veículo (CB). Os valores representam a média \pm EPM (n=6-14). * $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo VEI+CB; e # $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo VEI+STZ (ANOVA de uma via seguido de teste pos-hoc de Bonferroni).

4.4 DETERMINAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO APÓS DEPLEÇÃO DAS FIBRAS C EM ANIMAIS NAIVE.

Os animais tratados com RTX apresentaram o lado direito da face (ipsilateral à injeção) com menos coloração azul do que o lado esquerdo indicando menor extravasamento plasmático induzido pela aplicação de solução de capsaicina (5% em acetona) na face (painel A). A administração de acetona em animais controle não alterou a coloração na face dos mesmos (painel B). A análise de absorvância revelou que o tecido ipsilateral à injeção apresentou menos concentração de Azul de Evans confirmando o menor extravasamento plasmático em relação ao lado oposto da face (painel C).

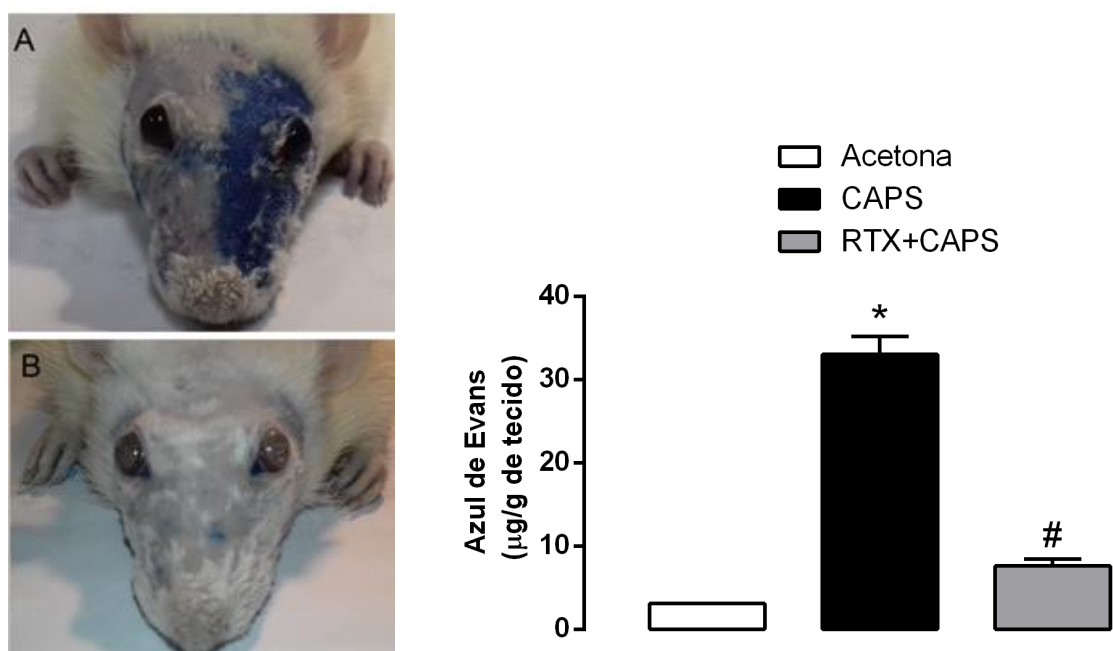


FIGURA 8 - EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO

Após 48 horas da administração intraganglionar de resiniferatoxina (RTX - 200 ng/10 µL) foi realizado o extravasamento plasmático para confirmar a depleção das fibras C. Os animais receberam uma solução de azul de Evans na veia peniana (30 mg/Kg, 1 mL/Kg), seguidamente foi aplicada uma solução de capsaicina na face (400 µL, 5% em acetona) (painel A) ou somente acetona para os animais controle (painel B). Após 15 minutos foi realizada a eutanásia dos animais ainda anestesiados e retirada da pele do lado direito e esquerdo da face para análise quantitativa da absorvância (painel C). Os valores representam a média ± EPM (n=3-4). *,# p≤0,05 (ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Bonferroni).

4.5 AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DE RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM ANIMAIS DIABÉTICOS.

Inicialmente em todos os grupos, os animais apresentaram uma latência para resposta basal similar. Contrariamente, na quarta semana após o tratamento com STZ, os ratos diabéticos apresentaram uma latência de resposta diminuída com relação aos animais tratados com CB, indicando um estado hiperalgésico (Fig. 9A , B e C).

Na quarta semana, o tratamento com CPZ no lábio superior direito dos animais diabéticos reverteu a hiperalgisia orofacial ao calor por uma hora em comparação ao grupo controle (Fig 9A).

Entretanto, em outro grupo de animais diabéticos, a CPZ intraganglionar reverteu a hiperalgisia facial durante três horas após o tratamento (Fig 9B).

No último grupo de animais diabéticos, o tratamento com CPZ através de injeção subaracnóidea medular reverteu a hiperalgisia facial ao calor por duas horas (Fig 9C).

Em todos os experimentos, a administração de CPZ em ratos previamente tratados com CB, não induziu alterações significativas na latência de resposta (Fig 9A, B e C).

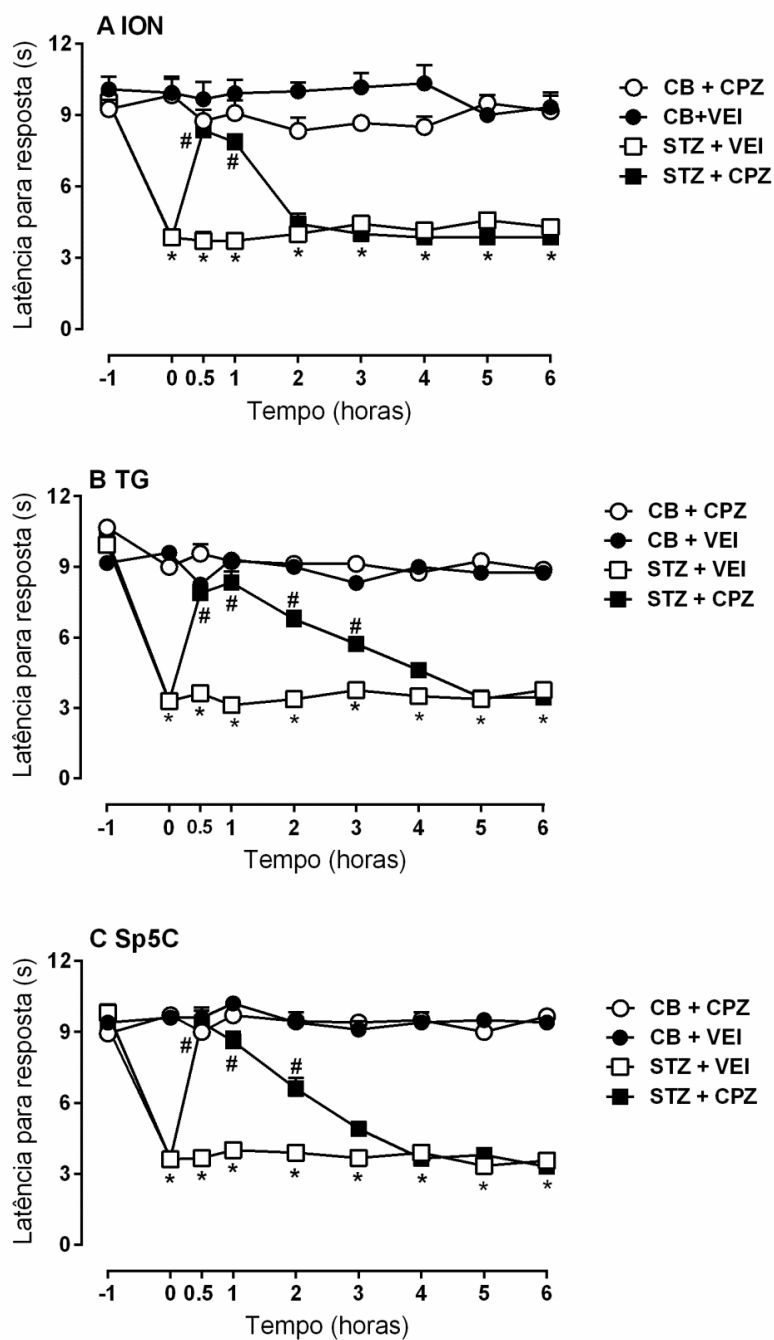


FIGURA 9 - EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA HIPERALGESIA FACIAL AO CALOR EM ANIMAIS DIABÉTICOS.

A latência de resposta dos animais ao calor foi avaliada antes (tempo -1) e quatro semanas após a indução do diabetes (tempo 0). Na quarta semana os animais foram tratados com capsazepina (CPZ) no lábio superior por via s.c. (ION; 30 µg/50 µL; painel A), no gânglio do trigêmeo (TG; 10 µg/10 µL; painel B) e no espaço subaracnóideo medular (Sp5C; 10 µg/10 µL; painel C). Animais de grupo controle foram tratados com veículo (VEI) no volume correspondente para cada via. A hiperálgia ao calor foi avaliada 0,5 até 6 horas após o tratamento. Os valores representam a média ± EPM (n=6-8). *p<0,05 quando comparado com o grupo CB+VEI e #p<0,05 quando comparado com o grupo STZ+VEI (ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Tukey).

4.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS E CENTRAIS EM ANIMAIS NAIVE E DIABÉTICOS

A avaliação da expressão de receptores TRPV1 quatro semanas após o tratamento dos animais com STZ ou CB (i.e veículo) revelou uma diminuição na expressão dos receptores TRPV1 no ION de animais diabéticos em relação ao grupo controle (Fig 10A). Em contraste, foi detectado um aumento da expressão de receptores TRPV1 no TG de animais diabéticos em comparação com os animais normoglicêmicos (Fig 10B). Não houve alteração significativa na expressão de receptores TRPV1 no Sp5C de animais diabéticos quando comparados aos normoglicêmicos (Fig 10C).

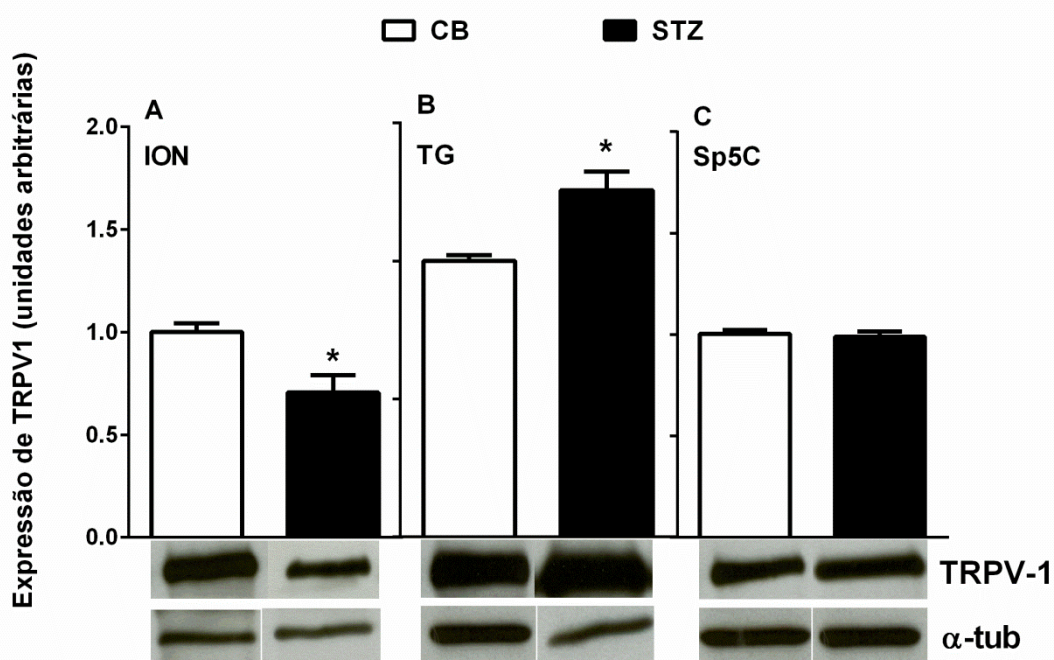


FIGURA 10 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TRPV1 NO NERVO INFRAORBITAL, NO GÂNGLIO DO TRIGÊMEO E NO SUBNÚCLEO CAUDALIS EM RATOS QUATRO SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES.

Amostras da porção final do nervo infraorbital (ION, painel A), gânglio do trigêmeo (TG, painel B) e subnúcleo caudalis (Sp5C, painel C) foram coletadas quatro semanas após o tratamento dos animais com estreptozotocina (STZ, 60 mg/Kg) ou veículo (CB, 10 Mm, pH 4,5, 1 mL/Kg) para análise da expressão dos receptores TRPV1 por Western Blot. A análise da expressão da α -tubulina nos diferentes tecidos foi utilizado como controle. A quantificação da intensidade dos sinais das bandas foi determinada por densitometria utilizando o software Image J. Os valores representam a média \pm EPM (n=6-8). *p<0,05 (Teste t de Student).

5 DISCUSSÃO

Existem evidências clínicas de que as alterações na transmissão da informação sensorial no sistema trigeminal poderiam estar relacionadas com o diabetes (ZIEGLER et al., 2008; ARAP et al., 2010; RAHIM-WILLIAMS et al., 2010). Estas observações vem sendo corroboradas por estudos pré-clínicos que utilizam a STZ para indução do diabetes em roedores (RODELLA et al., 2000; NONES et al., 2013; NGUYEN et al., 2015; XIE et al., 2015). Inúmeros estudos têm demonstrado que a administração sistêmica de STZ induz hiperglicemia constante, assim como alteração no peso corporal dos animais, condizente com uma diminuição da taxa de crescimento, que faz manter o seu peso estável por várias semanas após a indução do diabetes (FOX et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2009; BISHNOI et al., 2011). Esses achados são considerados características do modelo de diabetes tipo 1 por STZ. Corroborando essas observações, os resultados do presente estudo mostraram que a administração de STZ nos animais induziu hiperglicemia persistente, porém não alterou significativamente o ganho de peso em relação aos normoglicêmicos.

Existem evidências que relacionam o desenvolvimento da hiperalgesia a estímulos mecânicos, térmicos e químicos na pata de animais ao estado hiperglicêmico (CUNHA et al., 2009; CHRISTOPH et al., 2010; BISHNOI et al., 2011; PABREJA et al., 2011; CASTANY et al., 2016). Esses estudos demonstram que os animais diabéticos desenvolvem hiperalgesia mecânica a partir da segunda semana após a indução do diabetes (CUNHA et al., 2009) que pode permanecer até a quinta semana (BISHNOI et al., 2011). Outros estudos indicam que a administração subcutânea de formalina 2% na pata de animais diabéticos produz um aumento do número de respostas na fase inflamatória da formalina, quando comparado com animais normoglicêmicos (PABREJA et al., 2011). Ainda nesse sentido, existem evidências que indicam que os animais diabéticos desenvolvem hiperalgesia térmica na pata, na primeira semana e que permanece estável até a quinta semana após o tratamento com STZ (BISHNOI et al., 2011; CASTANY et al., 2016). Entretanto,

na região orofacial foi detectada apenas hiperalgesia térmica após a indução do diabetes por STZ (RODELLA et al., 2000; NONES et al., 2013; XIE et al., 2015), sem alterações no limiar mecânico, nem nas respostas induzidas pela formalina (NONES et al., 2013). De acordo com essas observações o presente estudo demonstrou que ratos com diabetes induzido por STZ desenvolvem hiperalgesia orofacial prolongada ao calor que parece estar relacionada com o estado hiperglicêmico, visto que o desenvolvimento da hiperalgesia foi prevenido pelo tratamento diário com insulina. Esses dados estão de acordo com estudos prévios que sugerem que a hiperalgesia na região orofacial em ratos diabéticos está relacionada com o estado hiperglicêmico (RODELLA et al., 2000; XIE et al., 2015).

No contexto clínico, tem sido sugerido que a hiperglicemia está associada com a maior prevalência e severidade da DND, e de acordo com alguns autores, os altos níveis de HbA1c estão principalmente relacionados com a severidade da DND mais do que com a duração do diabetes (DYCK et al., 1999; SUNDKVIST et al., 2000; DAHLIN et al., 2011). No presente estudo, os níveis elevados de HbA1c foram detectados quatro semanas após a indução do diabetes, os quais foram completamente normalizados com o tratamento diário com insulina imediatamente após a confirmação do estado diabético dos animais, reforçando a ideia de que o desenvolvimento da hiperalgesia facial ao calor em ratos tratados com STZ está relacionada com os altos níveis glicêmicos.

Os receptores TRPV1 são amplamente reconhecidos como integradores moleculares nos nociceptores sensoriais em condições fisiopatológicas (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA e TOMINAGA, 2005). Em estudos pré-clínicos, a injeção de capsaicina em diferentes tecidos craniofaciais tem sido extensamente utilizada para induzir *grooming* facial espontâneo, hiperalgesia ao calor, inflamação neurogênica e para avaliar a eficácia antinociceptiva de substâncias na dor trigeminal (FLORES et al., 2001; PELISSIER et al., 2002; MARVIZON et al., 2003; NEUBERT et al., 2006; LAM et al., 2009a; b; HUMMIG et al., 2014). No presente estudo, foi demonstrado que a injeção de capsaicina no lábio superior resultou em hiperalgesia orofacial ao calor, a qual foi

detectada aos 30 minutos após a administração e que permaneceu até a terceira hora.

A hiperalgesia facial ao calor após administração periférica da capsaicina é um fenômeno muito bem estabelecido, assim como a expressão de receptores TRPV1 funcionais nas terminações periféricas dos aferentes trigeminais (KARAI et al., 2004; PARK et al., 2006; PATWARDHAN et al., 2010). A CPZ tem sido amplamente utilizada como ferramenta para o bloqueio de receptores TRPV1 (DICKENSON e DRAY, 1991; HUANG et al., 2002; NICOLETTI et al., 2008; TALBOT et al., 2012; SREBRO et al., 2016), e no presente estudo o tratamento prévio com CPZ no lábio superior preveniu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica induzida por capsaicina, aplicada no mesmo sítio. Esses dados em conjunto mostram que os receptores TRPV1 periféricos medeiam a hiperalgesia térmica induzida por capsaicina no sistema sensorial trigeminal em ratos *naïve*.

A expressão de receptores TRPV1 no TG tem sido amplamente demonstrada, e alguns estudos também demonstraram interações funcionais destes com outros receptores, tais como endotelinérgicos, prurinérgicos e glutamatérgicos (CHICHORRO et al., 2010; LEE et al., 2012; SALOMAN et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2013). Estudos anteriores também demonstraram que a CPZ é capaz de bloquear o influxo de cálcio causado pela capsaicina em neurônios do DRG de ratos, em experimentos eletrofisiológicos *in vitro* (OH et al., 1996). Entretanto, apesar destas observações, esta é a primeira vez que se demonstra que a injeção direta *in vivo* de CPZ no TG é capaz de prevenir a hiperalgesia facial ao calor induzida pela administração periférica de capsaicina. Esse resultado corrobora estudos prévios que evidenciam que receptores TRPV1 funcionais expressos no TG contribuem na excitabilidade do aferente primário. De acordo com essas observações, existem evidências recentes de que os mecanismos ganglionares participam na modulação da excitabilidade dos neurônios aferentes primários após inflamação ou lesão de nervos (FERRARI et al., 2014; KIM et al., 2014).

Recentemente, receptores TRPV1 funcionais tem sido descritos também nos terminais centrais dos aferentes trigeminais, mais especificamente na

lamina superficial do Sp5C, onde parecem participar do processo de sensibilização central (KIM et al., 2014). Corroborando essa última observação, os resultados deste trabalho mostram que a injeção de CPZ no espaço subaracnóideo medular (i.e atingindo o subnúcleo caudalis) de ratos *naive* causou uma diminuição significativa de hiperalgesia facial ao calor induzida por capsaicina, indicando receptores TRPV1 funcionais neste local. Portanto, esses dados em conjunto mostram que a hiperalgesia ao calor induzida por capsaicina injetada no lábio superior foi prevenida pelo pré-tratamento com CPZ nos três diferentes locais, o que permitiu a utilização do mesmo protocolo para investigar a contribuição dos receptores TRPV1 periféricos e centrais na hiperalgesia facial ao calor em ratos diabéticos.

Alguns estudos têm sugerido que os receptores TRPV1 participam no desenvolvimento da hiperalgesia na pata de ratos diabéticos (HONG e WILEY, 2005; PABBIDI et al., 2008b; BISHNOI et al., 2011). Por outro lado, apesar das evidências de que roedores também desenvolvem hiperalgesia facial ao calor após indução do diabetes (RODELLA et al., 2000; NONES et al., 2013; XIE et al., 2015), o papel dos receptores TRPV1 ainda não havia sido investigado. Neste sentido, os resultados do presente estudo demonstraram pela primeira vez que a deleção dos receptores TRPV1 expressos nas fibras C pela administração intraganglionar de resiniferatoxina (RTX), preveniu totalmente o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor em ratos diabéticos. Esse protocolo foi validado em estudos prévios (KARAI et al., 2004; NEUBERT et al., 2005), bem como no presente estudo, em que a destruição das fibras que expressam receptores TRPV1 foi confirmada pela redução no número de *eye wipes* induzidos pela aplicação de uma solução 0,01% de capsaicina na córnea dos animais. Esse resultado sugere que os receptores TRPV1 desempenham um papel crucial na hiperalgesia facial ao calor em ratos diabéticos.

Está bem estabelecido que a administração de capsaicina e outros agonistas vanilóides provocam inicialmente sensações de irritação, ardor e dor, as quais podem ser seguidas de sensação de analgesia. De fato, na medicina tradicional as pimentas vermelhas (*chilis picantes*) tem sido utilizadas por diversas tribos na Ásia, América e Oceânia para o tratamento da dor, tanto em

forma tópica como em infusão. Sua ação farmacológica é o resultado da modulação da excitabilidade dos nociceptores periféricos que expressam receptores TRPV1, provocando inicialmente a ativação e subsequentemente a dessensibilização. A dessensibilização aguda ocorre nos primeiros 20 segundos após a primeira exposição ao agonista e é responsável pela perda da capacidade de resposta dos nociceptores. Neste tipo de dessensibilização destacam-se três mecanismos que poderiam participar simultaneamente: a desfosforilação do canal por calcineurina (DOCHERTY et al., 1996; MANDADI et al., 2004; MOHAPATRA e NAU, 2005), a interação com CaM (NUMAZAKI et al., 2003; ROSENBAUM et al., 2004; LISHKO et al., 2007) e a depleção de PIP2 na membrana plasmática (LIU et al., 2005; LUKACS et al., 2007; YAO e QIN, 2009). Diferentemente, na taquifilaxia se produz uma sucessiva diminuição na resposta ao aplicar estímulos breves e repetidos, que poderiam estar associados em parte, a uma falha na recuperação do canal. Ambos processos podem durar minutos a horas, e por conseguinte devem diferenciar-se da dessensibilização em longo prazo, que perdura semanas a meses, e inclusive pode ser irreversível, demonstrando um estado de desfuncionalização das vias neurais (LIU e SIMON, 1996), onde tem sido demonstrado existir a internalização do receptor TRPV1 (SANZ-SALVADOR et al., 2012). A capsaicina apresenta o inconveniente de ser muito irritante, por isto prefere-se a utilização do agonista RTX, já que provoca a dessensibilização em longo prazo sem os efeitos irritantes da capsaicina. A seletividade dos vanilóides sobre o TRPV1 tem sido amplamente demonstrada, assim como que a analgesia depende da dose e da potência dos agonistas. Assim, por exemplo, uma baixa dose de capsaicina provoca o silenciamento dos nociceptores, uma dose elevada pode provocar a neurodegeneração das fibras aferentes primárias (JANCOS e LAWSON, 1990). Esse processo neurodegenerativo ocorre pela entrada massiva de íons Ca^{2+} e afeta unicamente neurônios que expressam receptores TRPV1 (SZALLASI e BLUMBERG, 1990). A citotoxicidade é seletiva e depende da dose e via de administração do vanilóide, sendo que a analgesia pode durar semanas, ser reversível ou irreversível (NEUBERT et al., 2003). O protocolo de dessensibilização utilizado no presente estudo foi proposto por Karai e colaboradores, que demonstraram

que este processo perdurou por até um ano após a injeção intraganglionar de RTX (KARAI et al., 2004). Este protocolo é bastante útil na avaliação do papel das fibras que expressam TRPV1 e tem como vantagem a deleção seletiva dessas fibras do sistema sensorial trigeminal.

No presente estudo também foi demonstrado que os receptores TRPV1 periféricos e centrais participam na hiperalgesia facial ao calor associada com o diabetes experimental, predominantemente os receptores TRPV1 expressos no TG, bem como no Sp5C. De acordo com esses resultados, a análise da expressão de receptores TRPV1 nestes três locais revelou uma diminuição na expressão de receptores TRPV1 periféricos no ramo infraorbital do nervo trigêmeo, e um aumento na expressão dos receptores TRPV1 do TG em ratos diabéticos comparados com ratos *naive*, porém sem alterações no Sp5C.

Alguns estudos tem mostrado uma significativa perda de fibras intraepidermais em modelos experimentais de diabetes tipo 1 e tipo 2 (YAGIHASHI et al., 1990; CHU et al., 2012; BORIC et al., 2013). Além disso, evidências clínicas demonstram que nervos periféricos humanos apresentam uma diminuição das fibras nervosas e/ou atrofia axonal em pacientes com diferentes tipos de neuropatias comparado com pacientes controle (FACER et al., 2007). Essa perda ainda não foi demonstrada nos ramos periféricos do nervo trigêmeo, mas poderia explicar porque no presente estudo foi observada uma diminuição na expressão de receptores TRPV1 na porção periférica do nervo infraorbital. Entretanto, dados anteriores do nosso grupo demonstraram uma redução do volume ganglionar correspondente aos corpos celulares de neurônios, no TG de ratos diabéticos comparados com ratos normoglicêmicos, sugerindo uma perda de fibras sensoriais nos ratos diabéticos (NONES et al., 2013). Neste sentido, existem evidências que demonstram uma clara diminuição na expressão dos receptores TRPV1 em terminações nervosas de pacientes com dor neuropática quando comparado aos nervos controle, assim como uma diminuição na expressão dos receptores TRPV1 nas fibras intra- e sub-epidérmicas na pele de pacientes diabéticos, e adicionalmente à perda de fibras foi visto que a expressão dos receptores TRPV1 está diminuída nas fibras restantes (FACER et al., 2007).

Por outro lado, existem alguns estudos que demonstram um aumento na expressão de receptores TRPV1 no DRG de roedores após indução do diabetes (HONG e WILEY, 2005; PABBIDI et al., 2008b; CUI et al., 2014). Esses dados estão de acordo como o nosso resultado que mostra aumento de expressão de receptores TRPV1 no TG de animais diabéticos na quarta semana. Sabe-se que receptores TRPV1, assim como várias outras proteínas são sintetizadas nos corpos celulares das fibras, isto é no DRG ou TG, e posteriormente transportadas para os terminais periféricos e centrais dos aferentes primários (JI et al., 2002; BIGGS et al., 2007). Assim, uma possibilidade seria que o aumento dos níveis proteicos de receptores TRPV1 no TG estivesse precedendo um posterior aumento dos mesmos nos terminais periféricos e centrais dos aferentes trigeminais. Entretanto, o bloqueio da hiperalgesia facial ao calor resultante da administração intraganglionar de CPZ em ratos diabéticos permite especular que receptores TRPV1 funcionais estariam acumulados no corpo celular, onde participariam na sensibilização periférica dos aferentes trigeminais.

Os receptores TRPV1 localizados na medula espinhal também parecem contribuir nas diferentes condições dolorosas agudas e crônicas (SPICAROVA et al., 2014b). Em um modelo de dor aguda pós-operatória, uma única injeção intratecal do antagonista TRPV1 SB366791 reduziu significativamente a hiperalgesia térmica pós-incisional e atenuou a alodinia mecânica (SPICAROVA et al., 2014a). Além disso, em ratos diabéticos, a administração intratecal de RTX diminuiu significativamente a hiperalgesia ao calor induzida pela STZ, porém não diminuiu a alodinia mecânica, sugerindo uma importante contribuição dos receptores TRPV1 espinhais na hiperalgesia ao calor na pata de ratos diabéticos (BISHNOI et al., 2011). De acordo com esses achados, os resultados deste estudo demonstraram que o bloqueio farmacológico dos receptores TRPV1 centrais (i.e no Sp5C) produziu um bloqueio transitório da hiperalgesia facial ao calor. Nesse sentido, tem sido sugerido que em condições de dor crônica a ativação microglial na medula espinhal causa a liberação de citocinas pró-nociceptivas, tais como IL-1 β e TNF α , que podem sensibilizar receptores TRPV1 (BINSHTOK et al., 2008; SPICAROVA e PALECEK, 2010). Adicionalmente, a expressão de receptores TRPV1 tem sido

demonstrada em micróglia e astrócitos, e sua ativação nessas células poderia levar à ativação das células da glia (KIM et al., 2006). De fato, estudos anteriores em ratos diabéticos têm demonstrado a ativação microglial (TSUDA et al., 2008; WODARSKI et al., 2009; BISHNOI et al., 2011). Além disso, o estudo de Bihnoi e colaboradores reportou um aumento dos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF α na medula espinhal de ratos diabéticos, assim como um aumento na expressão dos receptores TRPV1 (BISHNOI et al., 2011). Contrariamente a esse último trabalho, no presente estudo não foi detectado nenhuma alteração na expressão de receptores TRPV1 no Sp5C de ratos diabéticos comparados com ratos *naive*, mas é possível que ocorra um aumento na função destes receptores como consequência da indução do diabetes, visto que o nosso resultado demonstrou que o bloqueio dos receptores TRPV1 do subnúcleo caudalis de ratos diabéticos atenuou a hiperalgisia orofacial ao calor. Estudos adicionais são necessários para determinar a contribuição dos receptores TRPV1 na medula espinhal/Sp5C, mas as evidências atuais indicam que sua ativação nesses sítios pode contribuir para o desenvolvimento da sensibilização central, assim como no desenvolvimento e/ou manutenção da hiperalgisia associada com o diabetes experimental.

6 CONCLUSÃO

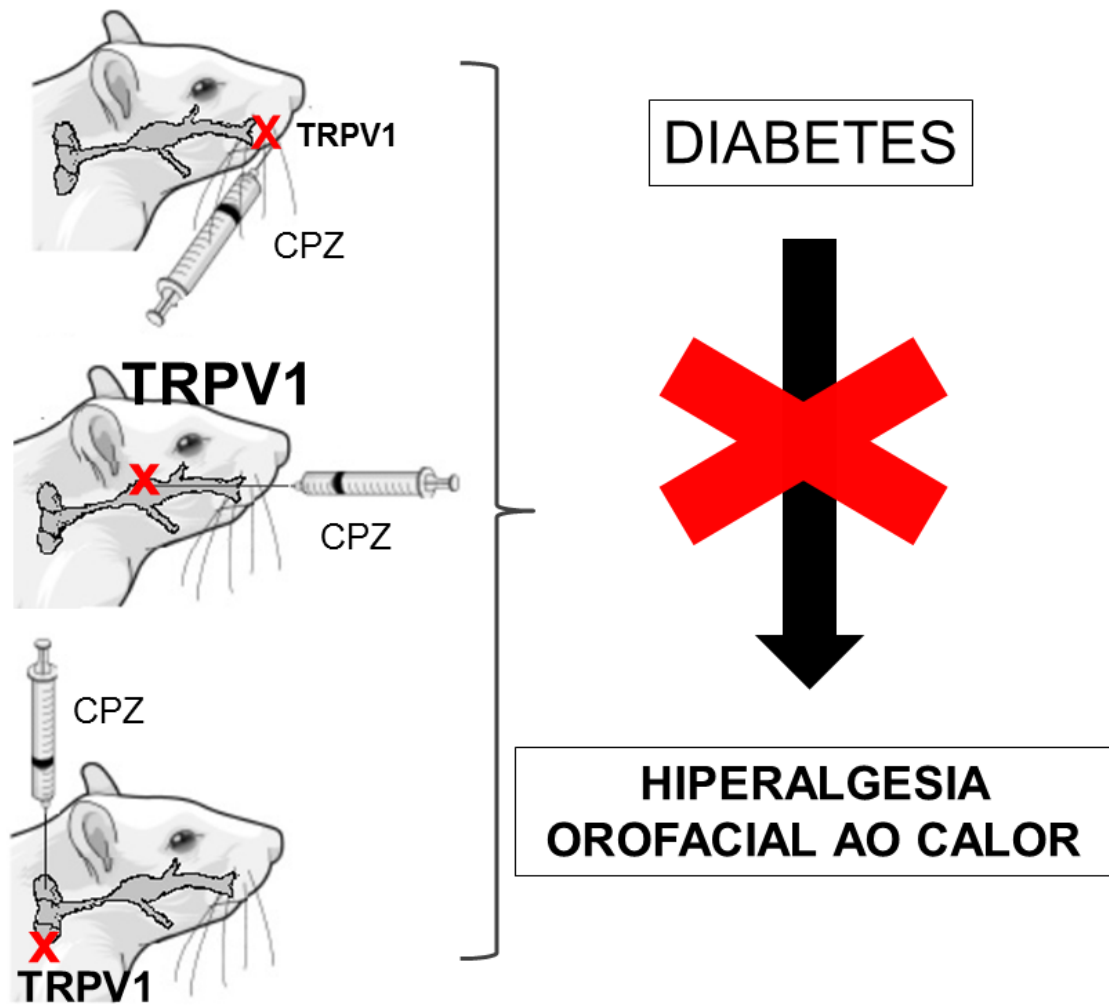
Os resultados do presente estudo mostraram que ratos com diabetes induzido por STZ desenvolvem hiperalgesia orofacial ao calor, e que o tratamento com insulina normalizou os níveis elevados de HbA1c, reforçando a ideia de que o desenvolvimento de hiperalgesia facial ao calor está relacionada com a hiperglicemia.

A ablação de receptores TRPV1 expressos nas fibras C pela administração intraganglionar de RTX preveniu totalmente o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor em ratos diabéticos. Esses dados sugerem que os receptores TRPV1 desempenham um papel crucial na hiperalgesia facial ao calor em ratos diabéticos.

Os receptores TRPV1 periféricos e centrais medeiam a hiperalgesia térmica induzida por capsacina no sistema sensorial trigeminal em ratos *naive*. Neste estudo foi demonstrado pela primeira vez que a injeção direta in vivo de CPZ no TG e no Sp5C é capaz de prevenir a hiperalgesia facial ao calor induzida pela administração periférica de capsaicina. Em conjunto os dados mostram que a hiperalgesia ao calor induzida por capsaicina injetada no lábio foi prevenida pelo pré-tratamento com CPZ nos três diferentes locais (nos ramos periféricos do nervo do trigêmeo, no TG e no Sp5C).

Além disso, os receptores TRPV1 expressos nos ramos periféricos do nervo do trigêmeo, no TG e no Sp5C participam na hiperalgesia facial ao calor em ratos diabéticos. Entretanto, os receptores TRPV1 ganglionares e centrais parecem ter um papel mais relevante na hiperalgesia orofacial ao calor em ratos diabéticos.

O esquema abaixo indica graficamente os sítios de bloqueio farmacológico dos receptores TRPV1 periféricos e centrais no sistema sensorial trigeminal, os quais parecem contribuir para a hiperalgesia orofacial ao calor associada ao diabetes.



ESQUEMA 1: RESUMO GRÁFICO DAS PRINCIPAIS CONCLUSÕES. A injeção de capsazepina (CPZ) no lábio superior, no gânglio do trigêmeo ou no espaço subaracnóideo medular resultou em redução significativa da hiperalgesia ao calor quatro semanas após a indução do diabetes, sugerindo a contribuição de receptores TRPV1 periféricos e centrais no desenvolvimento desta alteração sensorial.

REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.**; v. 38 p. S8-S16. 2015

AHERN, G. P. et al. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 21, p. 5109-5116, May 2005. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229387900002 >.

ALAWI, K. M. et al. The sympathetic nervous system is controlled by transient receptor potential vanilloid 1 in the regulation of body temperature. **Faseb Journal**, v. 29, n. 10, p. 4285-4298, Oct 2015. ISSN 0892-6638. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000361367300018 >.

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.

ARAP, A. et al. Trigeminal pain and quantitative sensory testing in painful peripheral diabetic neuropathy. **Archives of Oral Biology**, v. 55, n. 7, p. 486-493, Jul 2010. ISSN 0003-9969. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279967700004 >.

BAE, Y. C. et al. Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. **Journal of Comparative Neurology**, v. 478, n. 1, p. 62-71, Oct 2004. ISSN 0021-9967. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223672800005 >.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications - A new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 1-9, Jan 1999. ISSN 0012-1797. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000077741900001 >.

BENOLIEL, R.; ELIAV, E. Neuropathic orofacial pain. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, p. 237-54, 2008.

BEVAN, S.; ANDERSSON, D. A. TRP channel antagonists for pain - opportunities beyond TRPV1. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 10, n. 7, p. 655-663, Jul 2009. ISSN 1472-4472. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000267628200005 >.

BIGGS, J. E. et al. Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury. **European Journal of Pain**, v. 11, n. 2, p. 192-201, Feb 2007. ISSN 1090-3801. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243741000008 >.

BINSHTOK, A. M. et al. Nociceptors Are Interleukin-1 beta Sensors. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 52, p. 14062-14073, Dec 2008. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261985900006 >.

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, p. 11, Jul 2011. ISSN 1744-8069. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293944200001 >.

BORIC, M. et al. Reduced epidermal thickness, nerve degeneration and increased pain-related behavior in rats with diabetes type 1 and 2. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 53, p. 33-40, Nov 2013. ISSN 0891-0618. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329421900005 >.

BRAUCHI, S. et al. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. **Journal of Neuroscience**, v.

26, n. 18, p. 4835-4840, May 2006. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237271700014 >.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, Dec 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000172676200062 >.

CASTANY, S. et al. The antinociceptive effects of a delta-opioid receptor agonist in mice with painful diabetic neuropathy: Involvement of heme oxygenase 1. **Neuroscience Letters**, v. 614, p. 49-54, Feb 2016. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000370913500009 >.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, Oct 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997YC14800048 >.

CHICHORRO, J, **Neuralgia de trigêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental 193 f.** Tese (Doutorado em Farmacologia) Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CHICHORRO, J. G. et al. Endothelins as pronociceptive mediators of the rat trigeminal system: Role of ETA and ETB receptors. **Brain Research**, v. 1345, p. 73-83, Jul 2010. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280655400007 >.

CHICHORRO, J. G. et al. Mechanisms operated by endothelin ET(A) and ET(B) receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**, v. 43, n. 2, p. 133-142, Apr 2009. ISSN 0143-4179. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000265520700009 >.

CHRISTOPH, T.; DE VRY, J.; 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, n. 2, p. 91-94, Feb 2010. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274946900001 >.

CHRISTOPH, T. et al. Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 1, p. 238-243, Nov 2006. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241212700036 >.

CHU, C. C. et al. Generalized depletion of free nerve endings and decrease of cutaneous nervous innervation in streptozotocin-induced painful and painless diabetic rats. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 75, n. 7, p. 314-321, Jul 2012. ISSN 1726-4901. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000308617100004 >.

CHUNG, M. K. et al. Lipopolysaccharide-induced Pulpitis Up-regulates TRPV1 in Trigeminal Ganglia. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 9, p. 1103-1107, Sep 2011. ISSN 0022-0345. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293882400010 >.

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 426, n. 6966, p. 517-524, Dec 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186944300029 >.

CLAPHAM, D. E.; RUNNELS, L. W.; STRUBING, C. The TRP ion channel family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 6, p. 387-396, Jun 2001. ISSN 1471-0048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169165400015 >.

CUI, Y. Y. et al. Spatio-Temporal Expression and Functional Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Diabetic Mechanical Allodynia in Rats. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 10, Jul 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000339618600041 >.

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, Feb 2009. ISSN 0100-879X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264042800008 >.

DAHLIN, L. B. et al. Disturbed vibrotactile sense in finger pulps in patients with Type 1 diabetes-correlations with glycaemic level, clinical examination and electrophysiology. **Diabetic Medicine**, v. 28, n. 9, p. 1045-1052, Sep 2011. ISSN 0742-3071. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293905000007 >.

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.

DICKENSON, A. H.; DRAY, A. Selective antagonism of capsaicin by capsazepine - evidence for a spinal receptor-site in capsaicin-induced antinociception. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 4, p. 1045-1049, Dec 1991. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991GT19000045 >.

DOCHERTY, R. J. et al. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 431, n. 6, p. 828-837, Apr 1996. ISSN 0031-6768. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UK20000003 >.

DREL, V. R. et al. Evaluation of the peroxynitrite decomposition catalyst Fe(III) tetramesitylporphyrin octasulfonate on peripheral neuropathy in a mouse model of type 1 diabetes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, n. 6, p. 783-792, Dec 2007. ISSN 1107-3756. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251376900002 >.

DUBNER, R.; BENNETT, G. J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience**, v. 6, p. 381-418, 1983. ISSN 0147-006X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1983QE06600013 >.

DUX, M.; SANTHA, P.; JANCOS, G. The role of chemosensitive afferent nerves and TRP ion channels in the pathomechanism of headaches. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 464, n. 3, p. 239-248, Sep 2012. ISSN 0031-6768. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000307767800001 >.

DYCK, P. J. et al. Risk factors for severity of diabetic polyneuropathy - Intensive longitudinal assessment of the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. **Diabetes Care**, v. 22, n. 9, p. 1479-1486, Sep 1999. ISSN 0149-5992. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000082338500015 >.

FACER, P. et al. 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**, v. 7, p. 12, May 2007. ISSN 1471-2377. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247694000001 >.

FERNANDES, E. S.; FERNANDES, M. A.; KEEBLE, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 2, p. 510-521, May 2012. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000302796100010 >.

FERNANDES, E. S. et al. A Distinct Role for Transient Receptor Potential Ankyrin 1, in Addition to Transient Receptor Potential Vanilloid 1, in Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Inflammatory Hyperalgesia and Freund's Complete Adjuvant-Induced Monarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 3, p. 819-829, Mar 2011. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288095400036 >.

FERRARI, G. et al. Ocular Surface Injury Induces Inflammation in the Brain: In Vivo and Ex Vivo Evidence of a Corneal-Trigeminal Axis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 10, p. 6289-6300, Oct 2014. ISSN 0146-0404. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000343147100024 >.

FISCHER, L.; PARADA, C. A.; TAMBELLI, C. H. A novel method for subarachnoid drug delivery in the medullary region of rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 2, p. 108-112, Oct 2005. ISSN 0165-0270. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233151600002 >.

FLORES, C. M. et al. Capsaicin-evoked CGRP release from rat buccal mucosa: development of a model system for studying trigeminal mechanisms of neurogenic inflammation. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 1113-1120, Oct 2001. ISSN 0953-816X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000171795700008 >.

FOX, A. et al. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. **Pain**, v. 81, n. 3, p. 307-316, Jun 1999. ISSN 0304-3959. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000081180400009 >.

FRIED, K. et al. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. **Neuroscientist**, v. 7, n. 2, p. 155-165, Apr 2001. ISSN 1073-8584. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167812500018 >.

FUCHS, D. et al. Sensitized peripheral nociception in experimental diabetes of the rat. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 496-505, Nov 2010. ISSN 0304-3959. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282826100034 >.

GAO, Y. et al. Blocking of TRPV-1 in the parodontium relieves orthodontic pain by inhibiting the expression of TRPV-1 in the trigeminal ganglion during experimental tooth movement in rats. **Neuroscience Letters**, v. 628, p. 67-72, 2016.

GARCIA, M. D.; ADLER-GRASCHINSKY, E.; CELUCH, S. M. Enhancement of the hypotensive effects of intrathecally injected endocannabinoids by the entourage compound palmitoylethanolamide. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1-3, p. 75-80, May 2009. ISSN 0014-2999. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000266415600012 >.

GARCIA-SANZ, N. et al. Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 23, p. 5307-5314, Jun 2004. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221924800004 >.

GARCIA-SANZ, N. et al. A role of the transient receptor potential domain of vanilloid receptor I in channel Gating. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 43, p. 11641-11650, Oct 2007. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250577500022 >.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, Oct 2010. ISSN 0009-7330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000283583400006 >.

GOYARY, D.; SHARMA, R. Dietary restriction prevents diabetogenic effect of streptozotocin in mice. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 47, n. 4, p. 254-256, Aug 2010. ISSN 0301-1208. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282904900009 >.

HAN, S. K. et al. Functional type I vanilloid receptor expression by substantia gelatinosa neurons of trigeminal subnucleus caudalis in mice. **Neuroscience Letters**, v. 452, n. 3, p. 228-231, Mar 2009. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264653500003 >.

HAANPÄÄ, MAIJA, AND AKI HIETAHARJU. "Halting the March of Painful Diabetic Neuropathy." **Pain** 1, 2013.

HARGREAVES, K. M.; RUPAREL, S. Role of Oxidized Lipids and TRP Channels in Orofacial Pain and Inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 10, p. 1117-1123, Sep 2016. ISSN 0022-0345. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000382310400006 >.

HARRISON, S. et al. Capsaicin-like effects of N-arachidonoyl-dopamine in the isolated guinea pig bronchi and urinary bladder. **European Journal of Pharmacology**, v. 475, n. 1-3, p. 107-114, Aug 2003. ISSN 0014-2999. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185274900014 >.

HINDER, L. et al. Bioenergetic Metabolites in the Diabetic Peripheral Nervous System. **Neurology**, v. 78, p. 2, Apr 2012. ISSN 0028-3878. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000303204801457 >.

HOENDEROP, J. G. J. et al. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. **Embo Journal**, v. 22, n. 4, p. 776-785, Feb 2003. ISSN 0261-4189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181280100003 >.

HOLZER, P. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 8, p. 1145-1162, Dec 2008. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261501300003 >.

HONG, S. S.; WILEY, J. W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 1, p. 618-627, Jan 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226025100073 >.

HUANG, S. M. et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 12, p. 8400-8405, Jun 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000176217700107 >.

HUMMIG, W.; KOPRUSZINSKI, C. M.; CHICHORRO, J. G. Pregabalin Reduces Acute Inflammatory and Persistent Pain Associated with Nerve Injury and Cancer in Rat Models of Orofacial Pain. **Journal of Oral & Facial Pain and Headache**, v. 28, n. 4, p. 350-359, Fal 2014. ISSN 2333-0384. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000344838900009 >.

HWANG, S. W. et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 11, p. 6155-6160, May 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087318700086 >.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes Atlas**. IDF 2015. Disponível em: < http://www.idf.org/diabetesatlas >. Acesso em 11/01/2016.

JANCSO, G.; LAWSON, S. N. TRANSGANGLIONIC DEGENERATION OF CAPSAICIN-SENSITIVE C-FIBER PRIMARY AFFERENT TERMINALS. **Neuroscience**, v. 39, n. 2, p. 501-511, 1990. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990EP13200020 >.

JANCSO-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J.; JANCSO, N. STIMULATION AND DESENSITIZATION OF HYPOTHALAMIC HEAT-SENSITIVE STRUCTURES BY CAPSAICIN IN RATS. **Journal of Physiology-London**, v. 208, n. 2, p. 449-459, 1970. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1970G527300013 >.

Jl, R. R. et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57-68, Sep 2002. ISSN 0896-6273. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000178295100007 >.

JIN, K. L. et al. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 204-208, Aug 2004. ISSN 0026-895X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222791800002 >.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, Sep 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000170918800055 >.

JUNG, J. et al. Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44448-44454, Nov 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179272000116 >.

JUNG, J. Y. et al. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 8, p. 7048-7054, Feb 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188969200102 >.

JUNOD, A. et al. DIABETOGENIC ACTION OF STREPTOZOTOCIN - RELATIONSHIP OF DOSE TO METABOLIC RESPONSE. **Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 11, p. 2129-&, 1969. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1969E539300019 >.

KALICHMAN, M. W. et al. Nerve conduction velocity, laser Doppler flow, and axonal caliber in galactose and streptozotocin diabetes. **Brain Research**, v. 810, n. 1-2, p. 130-137, Nov 1998. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000077105300016 >.

KANAI, Y. et al. Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 733-738, May 2007. ISSN 0022-3573. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000246885300015 >.

KARAI, L. et al. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1344-1352, May 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221249500017 >.

KEDEI, N. et al. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 28613-28619, Jul 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000170093400115 >.

KIM, H. Y. et al. Differential changes in TRPV1 expression after trigeminal sensory nerve injury. **Journal of Pain**, v. 9, n. 3, p. 280-288, Mar 2008. ISSN 1526-5900. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254095700011 >.

KIM, S. R. et al. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4322-4329, Oct 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240787400015 >.

KIM, Y. S. et al. Central Terminal Sensitization of TRPV1 by Descending Serotonergic Facilitation Modulates Chronic Pain. **Neuron**, v. 81, n. 4, p. 873-887, Feb 2014. ISSN 0896-6273. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000331464400016 >.

KOPRUSZINSKI, C. M. et al. Vitamin B complex attenuated heat hyperalgesia following infraorbital nerve constriction in rats and reduced capsaicin in vivo and in vitro effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 326-332, Sep 2015. ISSN 0014-2999. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000359711100041 >.

LAM, D. K.; SESSLE, B. J.; HU, J. W. Glutamate and capsaicin effects on trigeminal nociception I: Activation and peripheral sensitization of deep craniofacial nociceptive afferents. **Brain Research**, v. 1251, p. 130-139, Jan 2009a. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000263304400013 >.

LAM, D. K.; SESSLE, B. J.; HU, J. W. Glutamate and capsaicin effects on trigeminal nociception II: Activation and central sensitization in brainstem neurons with deep craniofacial afferent input. **Brain Research**, v. 1253, p. 48-59, Feb 2009b. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000263738600005 >.

LEE, J. et al. Functional interactions between NMDA receptors and TRPV1 in trigeminal sensory neurons mediate mechanical hyperalgesia in the rat masseter muscle. **Pain**, v. 153, n. 7, p. 1514-1524, Jul 2012. ISSN 0304-3959. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000305423700026 >.

LISHKO, P. V. et al. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. **Neuron**, v. 54, n. 6, p. 905-918, Jun 2007. ISSN 0896-6273. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247645600010 >.

LIU, B. Y.; ZHANG, C. G.; QIN, F. Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 19, p. 4835-4843, May 2005. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229038300017 >.

LIU, L.; SIMON, S. A. Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells. **Journal of Neurophysiology**, v. 75, n. 4, p. 1503-1514, Apr 1996. ISSN 0022-3077. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UE79800015 >.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, Jul 2008. ISSN 0304-3959. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258359500005 >.

LUKACS, V. et al. Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 7070-7080, Jun 2007. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247619600023 >.

MACPHERSON, L. J. et al. The pungency of garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Current Biology**, v. 15, n. 10, p. 929-934, May 2005. ISSN 0960-9822. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229446500022 >.

MAGGI, C. A. et al. Similarities and differences in the action of resiniferatoxin and capsaicin on central and peripheral endings of primary sensory neurons. **Neuroscience**, v. 37, n. 2, p. 531-539, 1990. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990DZ06200023 >.

MALEK, N. et al. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 65, p. 1-10, Mar 2015. ISSN 1044-7431. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000353369100001 >.

MANDADI, S. et al. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. **Cell Calcium**, v. 35, n. 5, p. 471-478, May 2004. ISSN 0143-4160. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000220483300008 >.

MARVIZON, J. C. G. et al. Relationship between capsaicin-evoked substance P release and neurokinin 1 receptor internalization in the rat spinal cord. **Neuroscience**, v. 118, p. 535-545, 2003.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **Plos Medicine**, v. 3, n. 11, p. 20, Nov 2006. ISSN 1549-1277. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242374800009 >.

MOHAPATRA, D. P.; NAU, C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13424-13432, Apr 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228095500030 >.

MONTELL, C. An end in sight to a long TRP. **Neuron**, v. 30, n. 1, p. 3-5, Apr 2001. ISSN 0896-6273. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000168412900002 >.

MONTELL, C. Drosophila TRP channels. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 451, n. 1, p. 19-28, Oct 2005. ISSN 0031-6768. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000232372800003 >.

MORENILLA-PALAO, C. et al. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25665-25672, Jun 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221827900095 >.

NEUBERT, J. K. et al. Peripherally induced resiniferatoxin analgesia. **Pain**, v. 104, n. 1-2, p. 219-228, Jul 2003. ISSN 0304-3959. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000184262700024 >.

NEUBERT et al. Peripheral targeting of the trigeminal ganglion via the infraorbital foramen as a therapeutic strategy. **Brain Research Protocols**, v. 15, n. 3, p. 119-126, Sep 2005. ISSN 1385-299X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000232483000002 >.

NEUBERT, J. K. et al. Differentiation between capsaicin-induced allodynia and hyperalgesia using a thermal operant assay. **Behavioural Brain Research**, v. 170, n. 2, p. 308-315, Jun 2006. ISSN 0166-4328. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000238179500017 >.

NGUYEN, H. T. T. et al. Enhanced GABA action on the substantia gelatinosa neurons of the medullary dorsal horn in the offspring of streptozotocin-injected mice. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 29, n. 5, p. 629-636, Jul 2015. ISSN 1056-8727. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000356906400005 >.

NICOLETTI, P. et al. Ethanol causes neurogenic vasodilation by TRPV1 activation and CGRP release in the trigeminovascular system of the guinea pig. **Cephalalgia**, v. 28, n. 1, p. 9-17, Jan 2008. ISSN 0333-1024. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251385000003 >.

NONES, C. F. M. et al. Orofacial sensory changes after streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brain Research**, v. 1501, p. 56-67, Mar 2013. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316527000005 >.

NUMAZAKI, M. et al. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 8002-8006, Jun 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183845800105 >.

OATES, P. J. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 1, p. 14-36, Jan 2008. ISSN 1389-4501. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253937000003 >.

OBROSOVA, I. G. et al. Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy - The relation is revisited. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3435-3441, Dec 2005. ISSN 0012-1797. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233582500012 >.

OECD, **Cardiovascular Disease and Diabetes**: Policies for Better Health and Quality of Care. OECD Policy Studies, OECD publishing, Paris, p 15-16, 2015.

OH, U.; HWANG, S. W.; KIM, D. H. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 1659-1667, Mar 1996. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996TW14300008 >.

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, Mar 2008 [a]. ISSN 0026-895X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253444900040 >.

PABBIDI, R. M. et al. Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity. **Molecular Pain**, v. 4, p. 17, Mar 2008 [b]. ISSN 1744-8069. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254456200001 >.

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, n. 1-3, p. 15-21, Jul 2011. ISSN 0014-2999. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000291372600003 >.

PARK, C. K. Maresin 1 Inhibits TRPV1 in Temporomandibular Joint-Related Trigeminal Nociceptive Neurons and TMJ Inflammation-Induced Synaptic Plasticity in the Trigeminal Nucleus. **Mediators of Inflammation**, p. 9, 2015. ISSN 0962-9351. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000364915200001 >.

PARK, C. K. et al. Functional expression of thermo- transient receptor potential channels in dental primary afferent neurons - Implication for tooth pain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 25, p. 17304-17311, Jun 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000238326300057 >.

PATWARDHAN, A. M. et al. Heat generates oxidized linoleic acid metabolites that activate TRPV1 and produce pain in rodents. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1617-1626, May 2010. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277248000028 >.

PELISSIER, T.; PAJOT, J.; DALLEL, R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**, v. 96, n. 1-2, p. 81-87, Mar 2002. ISSN 0304-3959. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175738800011 >.

PEREIRINHA, C. **Influência da Diabetes Mellitus no processo da osteointegração**. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

PRITCHETT, Yili L., et al. Duloxetine for the management of diabetic peripheral neuropathic pain: response profile. **Pain Medicine**, v. 8, n 5, p. 397-409. 2007

QIAO, H. et al. Increased expression of TRPV1 in the trigeminal ganglion is involved in orofacial pain during experimental tooth movement in rats. **European Journal of Oral Sciences**, v. 123, n. 1, p. 17-23, Feb 2015. ISSN 0909-8836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000347707200003 >.

QUARTU, M. et al. TRPV1 receptor in the human trigeminal ganglion and spinal nucleus: immunohistochemical localization and comparison with the neuropeptides CGRP and SP. **Journal of Anatomy**, v. 229, n. 6, p. 755-767 Dec 2016.

RAHIM-WILLIAMS, B. et al. Influences of adult-onset diabetes on orofacial pain and related health behaviors. **Journal of Public Health Dentistry**, v. 70, n. 2, p. 85-92, Spr 2010. ISSN 0022-4006. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278620600001 >.

RAMSEY, I. S.; DELLING, M.; CLAPHAM, D. E. An introduction to TRP channels. In: (Ed.). Annual Review of Physiology. **Palo Alto: Annual Reviews**, v.68, 2006. p.619-647. (Annual Review of Physiology). ISBN 978-0-8243-0368-6.

REUSSER, F. MODE OF ACTION OF STREPTOZOTOCIN. **Journal of Bacteriology**, v. 105, n. 2, p. 580-&, 1971. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A19711412500019 >.

ROBERTS, J. C.; DAVIS, J. B.; BENHAM, C. D. H-3 resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. **Brain Research**, v. 995, n. 2, p. 176-183, Jan 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000187861300004 >.

RODELLA, L. et al. Nitric oxide involvement in the trigeminal hyperalgesia in diabetic rats. **Brain Research**, v. 865, n. 1, p. 112-115, May 2000. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087270400014 >.

ROGERIO, A. P.; ANDRADE, E. L.; CALIXTO, J. B. C-fibers, but not the transient potential receptor vanilloid 1 (TRPV1), play a role in experimental allergic airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 662, n. 1-3, p. 55-62, Jul 2011. ISSN 0014-2999. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000291577200008 >.

ROGLIC, G. et al. The burden of mortality attributable to diabetes - Realistic estimates for the year 2000. **Diabetes Care**, v. 28, n. 9, p. 2130-2135, Sep 2005. ISSN 0149-5992. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231525700007 >.

ROSENBAUM, T. et al. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. **Journal of General Physiology**, v. 123, n. 1, p. 53-62, Jan 2004. ISSN 0022-1295. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188090300005 >.

ROSENBERG, C. J.; WATSON, J. C. Treatment of painful diabetic peripheral neuropathy. **Prosthetics and Orthotics International**, v. 39, n. 1, p. 17-28, Feb 2015. ISSN 0309-3646. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000348638800004 >.

SALAT, K.; FILIPEK, B. Antinociceptive activity of transient receptor potential channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 antagonists in neurogenic and neuropathic pain models in mice. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 16, n. 3, p. 167-178, Mar 2015. ISSN 1673-1581. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000352144800001 >

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.

SALOMAN, J. L.; CHUNG, M. K.; RO, J. Y. P2X(3) and TRPV1 functionally interact and mediate sensitization of trigeminal sensory neurons. **Neuroscience**, v. 232, p. 226-238, Mar 2013. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000319172100021 >.

SANZ-SALVADOR, L. et al. Agonist- and Ca²⁺-dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 23, p. 19462-19471, Jun 2012. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000306411900060 >.

SELVARAJAH, D. et al. Central Nervous System Involvement in Diabetic Neuropathy. **Current Diabetes Reports**, v. 11, n. 4, p. 310-322, Aug 2011. ISSN 1534-4827. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292462500009 >.

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, Feb 2000. ISSN 1045-4411. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087007800003 >.

SESSLE, B. J. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 33, n. 4, p. 243-261, Apr 2006. ISSN 0305-182X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000236719300002 >.

SESSLE, B. J. et al. Properties and plasticity of the primate somatosensory and motor cortex related to orofacial sensorimotor function. **Clinical and Experimental**

Pharmacology and Physiology, v. 32, n. 1-2, p. 109-114, Jan-Feb 2005. ISSN 0305-1870. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227248700019 >.

SHEETZ, M. J.; KING, G. L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 20, p. 2579-2588, Nov 2002. ISSN 0098-7484. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179394500025 >.

SIEMENS, J. et al. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 208-212, Nov 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241867200041 >.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2014-2015. São Paulo: **AC Farmacêutica** 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016. São Paulo: **AC Farmacêutica** 2016.

SPICAROVA, D. et al. TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 75-84, Jun 2014a. ISSN 0028-3908. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000335632400008 >.

SPICAROVA, D.; NERANDZIC, V.; PALECEK, J. Update on the Role of Spinal Cord TRPV1 Receptors in Pain Modulation. **Physiological Research**, v. 63, p. S225-S236, 2014b. ISSN 0862-8408. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000332073100019 >.

SPICAROVA, D.; PALECEK, J. The Role of Spinal Cord Vanilloid (TRPV1) Receptors in Pain Modulation. **Physiological Research**, v. 57, p. S69-S77, 2008. ISSN 0862-8408. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262473500008 >.

SPICAROVA, D.; PALECEK, J. Tumor necrosis factor alpha sensitizes spinal cord TRPV1 receptors to the endogenous agonist N-oleoyldopamine. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 7, Aug 2010. ISSN 1742-2094. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282385800001 >.

SREBRO, D.; VUCKOVIC, S.; PROSTRAN, M. PARTICIPATION OF PERIPHERAL TRPV1, TRPV4, TRPA1 AND ASIC IN A MAGNESIUM SULFATE-INDUCED LOCAL PAIN MODEL IN RAT. **Neuroscience**, v. 339, p. 1-11, Dec 2016. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000389168500001 >.

STAROWICZ, K. et al. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 50, p. 13739-13749, Dec 2007. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251616000017 >.

STUCKY, C. L. et al. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 2-23, Apr 2009. ISSN 0165-0173. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000265769600002 >.

SUGIMOTO, K.; MURAKAWA, Y.; SIMA, A. A. F. Diabetic neuropathy - a continuing enigma. **Diabetes-Metabolism Research and Reviews**, v. 16, n. 6, p. 408-433, Nov-Dec 2000. ISSN 1520-7560. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166423900003 >.

SUN, W. 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. 15, Jun 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000305781700055 >.

SUNDKVIST, G. et al. Sorbitol and myo-inositol levels and morphology of sural nerve in relation to peripheral nerve function and clinical neuropathy in men with diabetic, impaired, and normal glucose tolerance. **Diabetic Medicine**, v. 17, n. 4, p. 259-268, Apr 2000. ISSN 0742-3071. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087257400002 >.

SZALLASI, A. The vanilloid (capsaicin) receptor - receptor types and species-differences. **General Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 223-243, Mar 1994. ISSN 0306-3623. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994ND57000001 >.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. **Life Sciences**, v. 47, n. 16, p. 1399-1408, 1990. ISSN 0024-3205. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990EE11200002 >.

SZALLASI, A. et al. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 5, p. 357-372, May 2007. ISSN 1474-1776. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000246306700013 >.

TALBOT, S. et al. Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional Kinin B-1 receptor in rat spinal cord microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 17, Jan 2012. ISSN 1742-2094. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000300450600001 >.

TESFAYE, S. et al. Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments. **Diabetes Care**, v. 33, n. 10, p. 2285-2293, Oct 2010. ISSN 0149-5992. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000283205100029 >.

TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes-Metabolism Research and Reviews**, v. 28, p. 8-14, Feb 2012. ISSN 1520-7552. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000299377700003 >.

TESFAYE, S.; BOULTON, A. J. M.; DICKENSON, A. H. Mechanisms and Management of Diabetic Painful Distal Symmetrical Polyneuropathy. **Diabetes Care**, v. 36, n. 9, p. 2456-2465, Sep 2013a. ISSN 0149-5992. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000323420200025 >.

TESFAYE, S. et al. 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, n. 12, p. 2616-2625, Dec 2013b. ISSN 0304-3959. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000327596200009 >.

THALAKOTI, S. et al. Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: Implications for migraine pathology. **Headache**, v. 47, n. 7, p. 1008-1023, Jul-Aug 2007. ISSN 0017-8748. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248083000005 >.

THE CRANIAL NERVES, **Organization of the Central Nervous System** - Part 3. <http://what-when-how.com/neuroscience/the-cranial-nerves-organization-of-the-central-nervous-system-part-3/>. Acesso em 09/01/2017.

THULESEN, J. et al. Short term insulin treatment prevents the diabetogenic action of Streptozotocin in rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 62-68, Jan 1997. ISSN 0013-7227. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997VZ82400011 >.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 531-543, Sep 1998. ISSN 0896-6273. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000076196400010 >.

TOMINAGA, M.; TOMINAGA, T. Structure and function of TRPV1. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, v. 451, n. 1, p. 143-150, Oct 2005. ISSN 0031-6768. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000232372800017 >.

TSUDA, M. et al. Activation of Dorsal Horn Microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. *Glia*, v. 56, n. 4, p. 378-386, Mar 2008. ISSN 0894-1491. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253277100002 >.

URATA, K. et al. Involvement of TRPV1 and TRPA1 in Incisional Intraoral and Extraoral Pain. *Journal of Dental Research*, v. 94, n. 3, p. 446-454, Mar 2015. ISSN 0022-0345. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000350151400008 >.

VALENTE, P. et al. Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor 1. *FASEB Journal*, v. 22, n. 9, p. 3298-3309, Sep 2008. ISSN 0892-6638. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258761300022 >.

VARENIUK, I. et al. Nitrosative stress and peripheral diabetic neuropathy in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Experimental Neurology*, v. 205, n. 2, p. 425-436, Jun 2007. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247108200013 >.

VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP channels. In: (Ed.). *Annual Review of Biochemistry. Palo Alto: Annual Reviews*, v.76, 2007. p.387-417. (Annual Review of Biochemistry). ISBN 978-0-8243-0876-6.

VLACHOVA, V. et al. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 4, p. 1340-1350, Feb 2003. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181094300028 >.

WAITE, P.; ASHWELL, K. Trigeminal Sensory System. *The Human Nervous System*. p. 1093-124, USA: Elsevier, 2004

WIFFEN P.J., et al. Pregabalin for acute and chronic pain in adults. *The Cochrane Library*, Issue 2. Art. No.: CD007076. Abr 2008.

WODARSKI, R. et al. Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pain*, v. 13, n. 8, p. 807-811, Sep 2009. ISSN 1090-3801. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000269901300004 >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Geneva, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Global data on visual impairments 2010**. Geneva, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics - **Diabetes**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/> Acesso em: 20/12/2016.

XIE, H. Y. et al. Increases in PKC gamma expression in trigeminal spinal nucleus is associated with orofacial thermal hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 63, p. 13-19, Jan 2015. ISSN 0891-0618. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000350939000003 >.

XU, H. X.; BLAIR, N. T.; CLAPHAM, D. E. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 39, p. 8924-8937, Sep 2005. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000232166100014 >.

YAGIHASHI, S.; KAMIJO, M.; WATANABE, K. Reduced myelinated fiber size correlates with loss of axonal neurofilaments in peripheral-nerve of chronically streptozotocin diabetic rats. **American Journal of Pathology**, v. 136, n. 6, p. 1365-1373, Jun 1990. ISSN 0002-9440. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990DJ77200019 >.

YAGIHASHI, S.; YAMAGISHI, S. L.; WADA, R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: Correlation with clinical signs and symptoms. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, p. S184-S189, Sep 2007. ISSN 0168-8227. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000249554200032 >.

YAMAMOTO, H. et al. Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 4, p. 403-408, Sep 2009. ISSN 0028-3908. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270020100008 >.

YAMAMOTO, T. et al. Endothelin Receptor-mediated Responses in Trigeminal Ganglion Neurons. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 4, p. 335-339, Apr 2013. ISSN 0022-0345. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316270100006 >.

YAO, J.; QIN, F. Interaction with Phosphoinositides Confers Adaptation onto the TRPV1 Pain Receptor. **Plos Biology**, v. 7, n. 2, p. 350-363, Feb 2009. ISSN 1544-9173. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000263599900014 >.

YOSHIDA, T. et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 11, p. 596-607, Nov 2006. ISSN 1552-4450. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241494000012 >.

ZIEGLER, A. E.; ZIMMER, H.; TRIEBIG, G. Exposure study on chemosensory effects of epsilon-caprolactam in the low concentration range. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 81, n. 6, p. 743-753, May 2008. ISSN 0340-0131. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253571700008 >.

ZYGMUNT, P. M. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 452-457, Jul 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000081715000051 >.

ANEXOS

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

FIGURA 3

Two-way RM ANOVA		Matching: Stacked				
Alpha	0,05					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Interaction	11,82	< 0,0001	****	Yes		
Time	8,222	< 0,0001	****	Yes		
Column Factor	28,18	< 0,0001	****	Yes		
Subjects (matching)	14,07	0,0193	*	Yes		
ANOVA table		SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	159,8	12	13,32	F (12, 180) = 4,978		P < 0,0001
Time	111,2	4	27,79	F (4, 180) = 10,39		P < 0,0001
Column Factor	380,9	3	127,0	F (3, 45) = 30,03		P < 0,0001
Subjects (matching)	190,2	45	4,227	F (45, 180) = 1,580		P = 0,0193
Residual	481,7	180	2,676			
Number of missing values	0					

FIGURA 4A

Number of comparisons per family		6		
Alpha	0,05			
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
cb-vei vs. cb-ins	-0,1740	-0,6595 to 0,3115	No	Ns
cb-vei vs. stz-vei	-1,230	-1,703 to -0,7567	Yes	****
cb-vei vs. stz-ins	-0,1392	-0,6021 to 0,3237	No	Ns
cb-ins vs. stz-vei	-1,056	-1,551 to -0,5606	Yes	****
cb-ins vs. stz-ins	0,03483	-0,4507 to 0,5203	No	Ns
stz-vei vs. stz-ins	1,091	0,6175 to 1,564	Yes	****

FIGURA 4B

Column B	
vs.	Insulina
Column A	
vs.	Veiculo
Mann Whitney test	
P value	
Exact or approximate P value?	0,6667
P value summary	Exact
Significantly different? (P < 0.05)	Ns
One- or two-tailed P value?	No
Sum of ranks in column A,B	Two-tailed
Mann-Whitney U	6,000 , 4,000
	1,000
Difference between medians	
Median of column A	
Median of column B	133,1
Difference: Actual	122,2
Difference: Hodges-Lehmann	-10,86
	-10,86

FIGURA 5A

Two-way ANOVA		Ordinary				
Alpha	0,05					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Interaction	11,13	0,0156	*	Yes		
Time	6,010	0,0072	**	Yes		
Column Factor	24,62	< 0,0001	****	Yes		
ANOVA table		SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	116,5	15	7,767	F (15, 158) = 2,041		P = 0,0156
Time	62,94	5	12,59	F (5, 158) = 3,307		P = 0,0072
Column Factor	257,9	3	85,95	F (3, 158) = 22,58		P < 0,0001
Residual	601,4	158	3,806			
Number of missing values	58					

FIGURA 5B

Two-way ANOVA		Ordinary			
Alpha		0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	22,80	< 0,0001	****	Yes	
Row Factor	10,77	< 0,0001	****	Yes	
Column Factor	37,03	< 0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	157,6	15	10,51	F (15, 192) = 10,12	P < 0,0001
Row Factor	74,47	5	14,89	F (5, 192) = 14,35	P < 0,0001
Column Factor	255,9	3	85,31	F (3, 192) = 82,17	P < 0,0001
Residual	199,3	192	1,038		
Number of missing values	24				

FIGURA 5C

Two-way ANOVA		Ordinary			
Alpha		0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	22,11	< 0,0001	****	Yes	
Row Factor	17,28	< 0,0001	****	Yes	
Column Factor	31,96	< 0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	118,9	15	7,930	F (15, 144) = 7,409	P < 0,0001
Row Factor	92,93	5	18,59	F (5, 144) = 17,37	P < 0,0001
Column Factor	171,9	3	57,30	F (3, 144) = 53,54	P < 0,0001
Residual	154,1	144	1,070		
Number of missing values	0				

FIGURA 6

Two-way ANOVA		Ordinary			
Alpha		0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	14,91	< 0,0001	****	Yes	
Row Factor	9,300	< 0,0001	****	Yes	
Column Factor	52,54	< 0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	48,09	12	4,007	F (12, 155) = 7,625	P < 0,0001
Row Factor	29,99	4	7,497	F (4, 155) = 14,27	P < 0,0001
Column Factor	169,4	3	56,47	F (3, 155) = 107,5	P < 0,0001
Residual	81,46	155	0,5255		
Number of missing values	105				

FIGURA 7A

Number of comparisons per family		2						
Alpha		0,05						
Bonferroni's test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary				
Vehic + sal vs. Vehic + cap	-14,16	-18,77 to -9,546	Yes	****				
Vehic + sal vs. RTX + Cap	-0,4405	-4,460 to 3,579	No	ns				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Vehic + sal vs. Vehic + cap	0,1429	14,30	-14,16	1,976	7	10	7,165	38
Vehic + sal vs. RTX + Cap	0,1429	0,5833	-0,4405	1,722	7	24	0,2558	38

FIGURA 7B

Number of comparisons per family		6						
Alpha		0,05						
Bonferroni's multiple comparisons test								
vei-cb + caps vs. rtx-cb + caps								
vei-cb + caps vs. vei-stz + caps		7,905	0,4173 to 15,39		Yes			*
vei-cb + caps vs. rtx-stz + caps		-2,167	-11,03 to 6,693		No			Ns
rtx-cb + caps vs. vei-stz + caps		6,583	-1,089 to 14,26		No			Ns
rtx-cb + caps vs. rtx-stz + caps		-10,07	-17,56 to -2,584		Yes			**
vei-stz + caps vs. rtx-stz + caps		-1,321	-7,358 to 4,715		No			Ns
		8,750	1,078 to 16,42		Yes			*

FIGURA 8

Number of comparisons per family	3						
Alpha	0,05						
Bonferroni's s test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary			
Control vs. Capsaicin	-29,92	-35,04 to -24,79	Yes	****			
Control vs. RTX	-4,559	-9,682 to 0,5651	No	ns			
Capsaicin vs. RTX	25,36	19,88 to 30,84	Yes	****			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t DF
Acetona vs. CAPS	3,105	33,02	-29,92	1,638	4	3	18,26 7
Acetona vs. RTX	3,105	7,664	-4,559	1,638	4	3	2,783 7
CAPS vs. RTX	33,02	7,664	25,36	1,751	3	3	14,48 7

FIGURA 9A

Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked					
Alpha	0,05					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Interaction	15,88	< 0,0001	****	Yes		
Time	10,08	< 0,0001	****	Yes		
Column Factor	59,45	< 0,0001	****	Yes		
Subjects (matching)	4,031	< 0,0001	****	Yes		
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interaction	299,9	24	12,50	F (24, 176) = 12,89	P < 0,0001	
Time	190,4	8	23,80	F (8, 176) = 24,54	P < 0,0001	
Column Factor	1123	3	374,2	F (3, 22) = 108,2	P < 0,0001	
Subjects (matching)	76,12	22	3,460	F (22, 176) = 3,568	P < 0,0001	
Residual	170,7	176	0,9696			
Number of missing values	0					

FIGURA 9B

Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked					
Alpha	0,05					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Interaction	17,38	< 0,0001	****	Yes		
Time	16,98	< 0,0001	****	Yes		
Column Factor	58,38	< 0,0001	****	Yes		
Subjects (matching)	1,672	< 0,0001	****	Yes		
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interaction	384,4	24	16,02	F (24, 232) = 36,36	P < 0,0001	
Time	375,6	8	46,96	F (8, 232) = 106,6	P < 0,0001	
Column Factor	1291	3	430,4	F (3, 29) = 337,5	P < 0,0001	
Subjects (matching)	36,98	29	1,275	F (29, 232) = 2,895	P < 0,0001	
Residual	102,2	232	0,4405			
Number of missing values	0					

FIGURA 9C

Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked					
Alpha	0,05					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Interaction	19,66	< 0,0001	****	Yes		
Time	10,92	< 0,0001	****	Yes		
Column Factor	60,27	< 0,0001	****	Yes		
Subjects (matching)	2,859	< 0,0001	****	Yes		
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interaction	551,7	24	22,99	F (24, 280) = 34,59	P < 0,0001	
Time	306,4	8	38,30	F (8, 280) = 57,63	P < 0,0001	
Column Factor	1691	3	563,7	F (3, 35) = 246,0	P < 0,0001	
Subjects (matching)	80,22	35	2,292	F (35, 280) = 3,449	P < 0,0001	
Residual	186,1	280	0,6646			
Number of missing values	0					

FIGURA 10A

Column B	STZ
vs.	vs,
Column A	CB
Mann Whitney test	
P value	0,0350
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	57,00 , 34,00
Mann-Whitney U	6,000
Difference between medians	
Median of column A	0,9655
Median of column B	0,5880
Difference: Actual	-0,3775
Difference: Hodges-Lehmann	-0,3575

Figura 10B

Column B	STZ
vs.	vs,
Column A	Control
Mann Whitney test	
P value	0,0047
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	23,00 , 68,00
Mann-Whitney U	2,000
Difference between medians	
Median of column A	0,9850
Median of column B	1,217
Difference: Actual	0,2320
Difference: Hodges-Lehmann	0,2355

FIGURA 10C

Column B	STZ
vs.	vs,
Column A	CB
Mann Whitney test	
P value	0,4777
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	Ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	62,50 , 57,50
Mann-Whitney U	21,50
Difference between medians	
Median of column A	1,020
Median of column B	0,9750
Difference: Actual	-0,04500
Difference: Hodges-Lehmann	-0,02500



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRO-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA
COORDENADORIA DE EXTENSÃO

Curso de Extensão Universitária

CERTIFICADO

Erika Ivanna Araya frequentou com aproveitamento o Curso de Extensão Universitária “CURSO TEÓRICO **SOBRE MANIPULAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**”, realizado no período de 30 de março a 03 de abril de 2015, num total de 40 horas/aula, conforme o programa no verso, promovido pelo Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Certificado registrado no Livro 47 sob o n.º 309.754, com frequência 100% e nota 9.

Curitiba, 19 de agosto de 2015.


Lara Picchioni Thielen
COORDENADORA DE EXTENSÃO