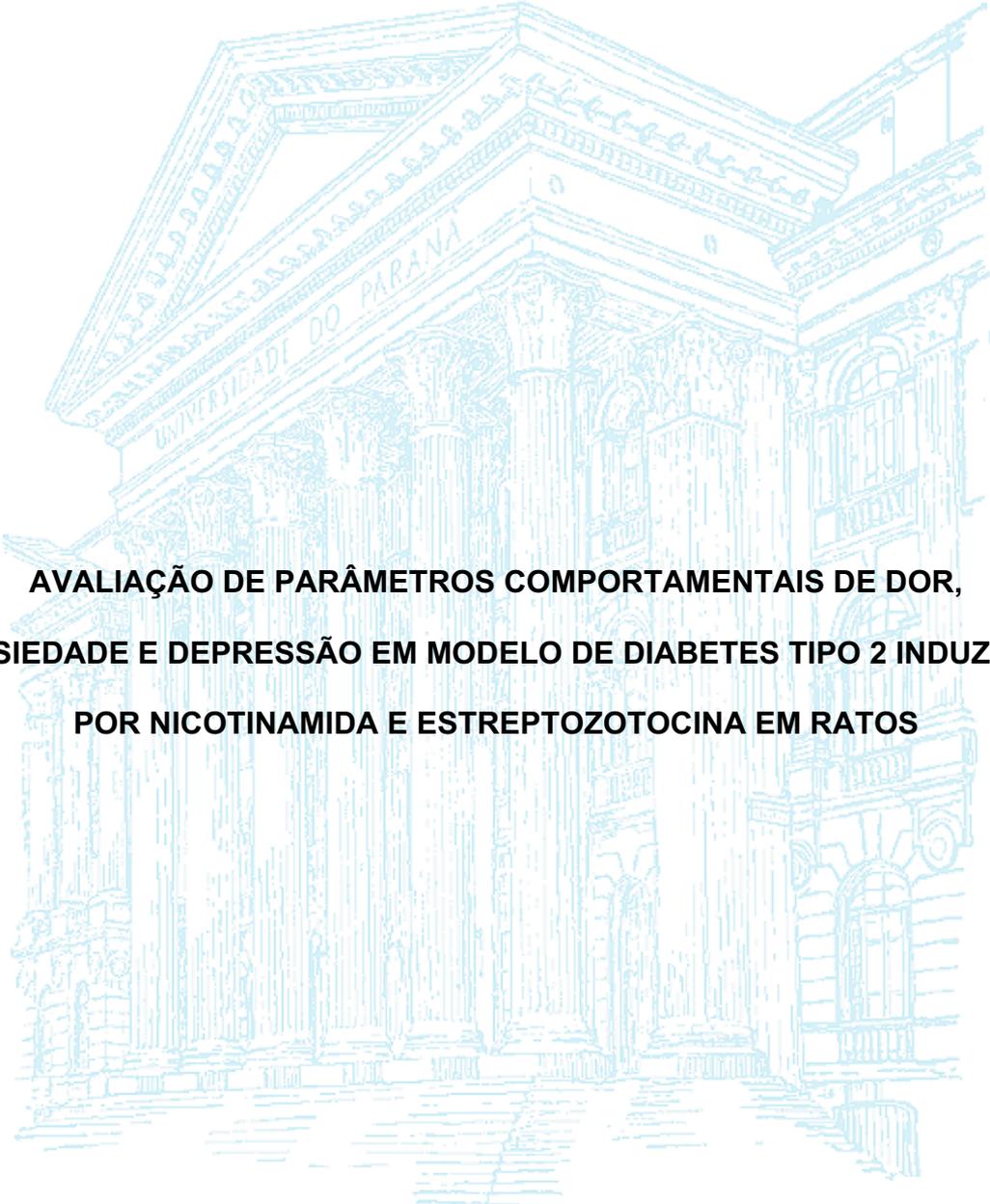


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATÁLIA DE SOUZA LEITE



**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE DOR,  
ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM MODELO DE DIABETES TIPO 2 INDUZIDO  
POR NICOTINAMIDA E ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS**

CURITIBA

2019

NATÁLIA DE SOUZA LEITE

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE DOR,  
ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM MODELO DE DIABETES TIPO 2 INDUZIDO  
POR NICOTINAMIDA E ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

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

CUITIBA

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus por todas as coisas boas que tem proporcionado em minha vida.

Aos meus pais, Eliane e Gilson, meus irmãos, Gabriel e Gilson Filho, meu padrasto, Marcelo e minha prima Rayra, vocês são muito especiais em minha vida, agradeço por toda ajuda, paciência e amor que sempre me deram. Sem você nada disso seria possível.

À minha orientadora, Joice Cunha, por todos os ensinamentos, por ter ajudado em meu crescimento profissional e por todas as palavras de conforto e também a professora Janaína por toda ajuda.

Quero agradecer também à professora Janaína que me acompanhou desde o início dos experimentos, me ajudou a esclarecer muitas dúvidas e que foi de grande importância para a realização desse trabalho.

Aos amigos que o laboratório de farmacologia da dor me trouxe, Evelize, Carlos, Aléxia, Ana e Felipe. Obrigada por toda paciência, ajuda e apoio que me deram e pelos momentos de descontração e risadas também. Sem vocês tudo isso seria muito mais difícil.

Ao meu namorado, Gustavo, por toda ajuda, companhia nos experimentos em finais de semana, paciência em me ouvir falar sobre diabetes, ratinhos, e experimentos todo o tempo, por todo amor e carinho que tem me dado. Você tem sido muito importante na minha vida.

Aos meus ratinhos, por doarem sua vida em prol da ciência.

À Universidade Federal do Paraná, por toda a estrutura proporcionada nesses 4 anos de graduação.

## RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) tipo 2, clinicamente, é o mais prevalente, representando 90% dos casos. Dor neuropática (DND), depressão e ansiedade são algumas das mais debilitantes e prevalentes complicações e comorbidades associadas ao diabetes. Os tratamentos farmacológicos utilizados para essas complicações são ineficazes, representando um desafio clínico. Assim, modelos animais são amplamente utilizados para a investigação de alternativas terapêuticas. Em relação ao DM do tipo 2, os modelos murinos em sua maioria estão associados a imposição de dietas hipercalóricas e dispõem de longo tempo de indução. O modelo de diabetes induzido por associação de estreptozotocina (STZ) e nicotinamida (NA) apresenta melhor viabilidade financeira e menor tempo de desenvolvimento da doença. Neste modelo, uma baixa dose de STZ é utilizada para mimetizar a perda parcial de massa de células  $\beta$ -pancreáticas no DM2, enquanto a nicotinamida é aplicada contra a lesão de células  $\beta$ -pancreáticas induzida pela STZ. Utilizando este modelo, até o presente momento, não há estudos comportamentais envolvendo dor, depressão e ansiedade, o que foi o objetivo deste projeto. Para isso, ratos *Wistar* machos foram divididos em três grupos experimentais principais: normoglicêmicos (NGL), pré-diabéticos tratados com STZ (45 mg/kg) mais NA (110 mg/kg; PD-45) e pré-diabéticos tratados com STZ (55 mg/kg) mais NA (100 mg/kg; PD-55). Os animais pré-diabéticos foram posteriormente divididos em dois subgrupos submetidos ao tratamento diário por via oral (a partir do sétimo após a diabetização) com veículo (água; volume equivalente) ou metformina (MET; 25 mg/kg). Os animais foram testados quanto a resposta nociceptiva por meio do teste de Von Frey eletrônico no 1º dia de experimento e nos 7º, 14º, 21º e 28º dias após a diabetização. Também foram testados quanto ao comportamento tipo-ansioso através do teste do labirinto em cruz elevado no 29º dia após a diabetização, quanto ao comportamento tipo-depressivo através do teste do nado forçado no 31º após a diabetização e quanto a resposta a glicose no 32º dia. Os animais dos grupos PD-45 e PD-55 apresentaram ligeiro aumento na glicemia, sendo este mais evidente nos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos no ganho de peso e nem na resposta a glicose. Houve significativa redução do limiar mecânico a partir do 14º dia após a administração somente nos grupos tratados com a dose maior de STZ (PD-55) bem como significativo aumento do comportamento tipo-ansioso, efeitos esses não alterados pelo tratamento com metformina. Quanto ao

comportamento tipo-depressivo não houve diferença significativa entre os grupos. Esse estudo demonstrou que ambas as doses de STZ-NA utilizadas não foram capazes de mimetizar completamente um modelo de diabetes tipo 2, mas sim um estado de pré-diabetes. Alguns parâmetros poderiam melhor caracterizar esse estado, como por exemplo, a quantificação de insulina plasmática e também uma extensão do tempo de análise, o que representaram as principais limitações do presente estudo.

Palavras-chave: nicotinamida, estreptozotocina, neuropatia, diabetes tipo 2.

## ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM) is clinically the most prevalent, representing 90% of cases. Neuropathic pain (NDD), depression and anxiety are some of the most debilitating and prevalent complications and comorbidities associated with diabetes. The pharmacological treatments used for these complications are ineffective, representing a clinical challenge. Thus, animal models are widely used for the investigation of therapeutic alternatives. Regarding type 2 DM, most murine models are associated with the imposition of hypercaloric diets and spend a long time inducing. The model of diabetes induced by streptozotocin (STZ) and nicotinamide (NA) association presents better financial viability and shorter disease development time. In this model, a low dose of STZ is used to mimic partial loss of  $\beta$ -pancreatic cell mass in DM2, while nicotinamide is applied against STZ-induced  $\beta$ -pancreatic cell injury. Using this model, to date, there are no behavioral studies involving pain, depression and anxiety, which was the objective of this project. For this, male Wistar rats were divided into three main experimental groups: normoglycemic (NGL), STZ-treated pre-diabetics (45 mg/kg) plus NA (110 mg/kg; PD-45) and STZ-treated pre-diabetics (55 mg/kg) plus NA (100 mg/kg; PD-55). Pre-diabetic animals were further divided into two subgroups undergoing daily oral treatment (from the seventh post-diabetes) with vehicle (water; equivalent volume) or metformin (MET; 25 mg/kg). The animals were tested for nociceptive response by the electronic von Frey test on the 1st day of the experiment and on the 7th, 14th, 21st and 28th days after diabetes. They were also tested for anxiety type behavior through the elevated cross-maze test on the 29th day after diabetes, for depressive-type behavior through the forced swim test on the 31st after diabetes and for the glucose response on the 32nd day. Animals from the PD-45 and PD-55 groups showed a slight increase in glycemia, which was more evident in the PD-55 + VEI and PD-55 + MET groups. In addition, there was no significant difference between groups in weight gain or glucose response. There was a significant reduction in the mechanical threshold from day 14 after administration only in the groups treated with the higher dose of STZ (PD-55) as well as a significant increase in anxious-type behavior, effects not altered by metformin treatment. Regarding the type-depressive behavior there was no significant difference between the groups. This study demonstrated that both doses of STZ-NA used were not able to completely mimic a type 2 diabetes model, but rather a pre-diabetes state. Some parameters could better characterize this state, such as the quantification of plasma insulin and also an extension of the analysis time, which represented the main limitations of the present study.

Keywords: nicotinamide, streptozotocin, neuropathy, type 2 diabetes.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DE ESTREPTOZOTOCINA E DA NICOTINAMIDA.....	24
FIGURA 2 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
FIGURA 3 – EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NOS NÍVEIS DE GLICOSE E PESO CORPORAL DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS PD-45+VEI e PD-45+MET.....	32
FIGURA 4 – EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NOS NÍVEIS DE GLICOSE E PESO CORPORAL DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS PD-55+VEI e PD-55+MET.....	33
FIGURA 5 – EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA SOBRE A RESPOSTA A GLICOSE DOS ANIMAIS.....	34
FIGURA 6 – EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NA ALODINIA MECANICA DOS ANIMAIS.....	36
FIGURA 7 – EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS PD-45+VEI e PD-45+MET.....	38
FIGURA 8 -- EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS PD-55+VEI e PD-55+MET.....	39
FIGURA 9 – EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS PD-45+VEI, PD-45+MET, PD-55+VEI e PD55+MET.....	40
FIGURA 10 – EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIONO DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS PD-45+VEI e PD-45+MET ATRAVÉS DO NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS ABERTOS E NOS BRAÇOS FECHADOS.....	42

FIGURA 11 -- EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA- NICOTINAMIDA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIONO DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS PD-45+VEI e PD-45+MET ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DO TEMPO NOS BRAÇOS ABERTOS E NOS BRAÇOS FECHADOS.....	43
FIGURA 12 -- EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA- NICOTINAMIDA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIONO DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS PD-55+VEI e PD-55+MET ATRAVÉS DO NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS ABERTOS E NOS BRAÇOS FECHADOS.....	44
FIGURA 13 -- EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA- NICOTINAMIDA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIONO DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS PD-55+VEI e PD-55+MET ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DO TEMPO NOS BRAÇOS ABERTOS E NOS BRAÇOS FECHADOS.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGE – produtos finais de glicação avançada

AMPA – ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

DM - diabetes *mellitus*

DM1 – diabetes *mellitus* tipo 1

DM2 – diabetes *mellitus* tipo 2

DND – dor neuropática diabética

GABA – ácido gama-aminobutírico

HPA – eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal

NA – nicotinamida

NAMPT – nicotinamida fosforiltransferase

NGL+VEI – Grupo de animais normoglicêmicos tratados com veículo

Nmnat - mononucleotídeo adeniltransferase

NO – óxido nítrico

PARP – poli (ADP- ribose) polimerase

PD-45+MET– grupo de animais que receberam a injeção de estreptozotocina-nicotinamida (45 mg/kg-110 mg/kg, respectivamente) e foram tratados com metformina

PD-45+VEI – grupo de animais que receberam a injeção de estreptozotocina-nicotinamida (45 mg/kg - 110 mg/kg, respectivamente) e foram tratados com veículo

PD-55+MET – grupo de animais que receberam a injeção de estreptozotocina-nicotinamida (55 mg/kg-100 mg/kg, respectivamente) e foram tratados com metformina

PD-55+VEI – grupo de animais que receberam a injeção de estreptozotocina-nicotinamida (55 mg/kg-100 mg/kg, respectivamente) e foram tratados com veículo

PKC – proteína quinase C

PRPP – 5-fosforribosilpirofosfato

ROS – radicais livres de oxigênio

STZ – estreptozotocina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
1.2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 DIABETES TIPO 2 .....	16
2.2 DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA .....	17
2.3. DEPRESSÃO E ANSIEDADE ASSOCIADAS AO DIABETES.....	20
2.4. MECANISMO DE AÇÃO DA NICOTINAMDA E ESTREPTOZOTOCINA..	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 ANIMAIS .....	26
3.2 INDUÇÃO AO DIABETES EXPERIMENTAL .....	26
3.3 TRATAMENTO .....	27
3.4 VON FREY ELETRÔNICO .....	27
3.5 CAMPO ABERTO .....	28
3.6 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO .....	28
3.7 NADO FORÇADO .....	28
3.9 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	29
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, (2017, p. 16), o diabetes *mellitus* (DM), é uma doença metabólica crônica que ocorre quando existem níveis elevados de glicose no sangue devido à ausência ou produção insuficiente pelas células  $\beta$ -pancreáticas do hormônio peptídico insulina ou resistência dos tecidos a ação desse hormônio. A principal função da insulina é promover a entrada de glicose na célula, e a falta desta causa um aumento de glicose no sangue levando ao estado de hiperglicemia. O diabetes é clinicamente classificado em três subtipos distintos: 1) diabetes tipo 1 (DM1), também denominada insulino-dependente; 2) diabetes tipo 2 (DM2) ou não insulino-dependente e 3) Diabetes gestacional. O DM1 é caracterizado pela destruição das células  $\beta$ -pancreáticas produtoras de insulina causada por uma reação autoimune. Como resultado, o organismo produz pouca ou nenhuma insulina, provocando uma deficiência relativa ou absoluta deste hormônio. DM2 é a forma mais frequente de DM, que representa 90% de todos os pacientes diabéticos. No DM2, a hiperglicemia é resultado de uma produção inadequada de insulina e a incapacidade do organismo de responder eficientemente a esse hormônio, o que se define como resistência à insulina. Primeiro, se dispara a produção deste hormônio a fim de reduzir o aumento dos níveis de glicose sanguínea, mas, com o tempo, pode desenvolver-se um estado de produção relativamente inadequada de insulina. O diabetes gestacional é uma forma de diabetes que consiste em níveis elevados de glicose sanguínea durante a gravidez que geralmente desaparece após a gestação, mas que predispõe as mulheres com diabetes gestacional e seus filhos a um maior risco de desenvolver DM2 posteriormente (IDF, 2019; YANLING et al., 2014; ALAM et al., 2014).

O DM é um problema mundial que vem aumentando, devido ao envelhecimento da população, maus hábitos de vida como, sedentarismo, tabagismo e alcoolismo. Nesse ano de 2019, foram contabilizados cerca de 463 milhões de pessoas afetadas com essa doença, um terço das quais são pessoas com mais de 65 anos. Segundo os cálculos, estima-se que o número de pessoas com diabetes pode aumentar para 578 milhões em 2030 e 700 milhões até 2045. No Brasil, também durante no ano de 2019, foram contabilizados cerca de 16,8

milhões de pessoas convivendo com o diabetes. Esse elevado número de casos gera um custo substancial sobre o sistema de saúde em todo o mundo, sendo que neste ano a Instituição Internacional do Diabetes estima que os custos sanitários dedicados ao tratamento de diabetes e suas complicações alcançarão 760 bilhões de dólares. No Brasil, esse número já alcançou 52,3 bilhões de dólares. Essas complicações são designadas microvasculares e macrovasculares, podendo afetar o sistema cardiovascular, visão, rins e nervos, aumentando os custos da atenção sanitária e diminuindo a qualidade de vida (IDF, 2019). Dentre as complicações microvasculares, a neuropatia diabética apresenta maior prevalência, levando a maiores taxas de internações e amputações não traumáticas e incapacidade física (NASCIMENTO; PUPE; CAVALCANTI, 2016).

A neuropatia diabética é um conjunto de síndromes que afetam regiões distintas do sistema nervoso e é definida como a presença de sintomas e/ou sinais de disfunção nervosa periférica em diabéticos após exclusão de outras causas (SINGH; KISHORE; KAUR, 2014). Embora pacientes diabéticos possam manifestar diversas formas de neuropatia, a polineuropatia distal simétrica (PDS) é a forma mais comum acometendo aproximadamente metade dos pacientes (RUSSELL; ZILLIOX, 2014).

Cerca de 20% dos pacientes diabéticos com neuropatia sofrem de dor neuropática (LECHLEITNER et al., 2016). Os sintomas da dor neuropática variam desde sensações anormais, como parestesia, alodinia (dor em resposta a estímulos normalmente inócuos), hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nocivos) e dor espontânea (CALCUTT, 2002; MONDELLI et al., 2011). Sendo assim, a dor neuropática pode afetar múltiplos aspectos da saúde e qualidade de vida do paciente, incluindo o humor, o sono e os processos cognitivos.

Transtornos do humor, como depressão e ansiedade, são frequentemente observados em pacientes que sofrem de dor crônica (YALCIN; BARTHAS; BARROT, 2014). A depressão é caracterizada pelo humor depressivo, anedonia, energia reduzida, sentimento de culpa ou baixa autoestima, alterações do sono ou do apetite e falta de concentração. A depressão é uma condição que, rotineiramente, apresenta sintomas concomitantes de ansiedade - entre 50 e

75% dos indivíduos diagnosticados com depressão maior em ambientes de atenção primária também são diagnosticados com um transtorno de ansiedade comórbido (NAICKER et al., 2018). A prevalência de depressão em pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2 é maior em comparação com a população não diabética (DZIEMIDOK; DĄBROWSKI; MAKARA-STUDZIŃSKA, 2015).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A taxa de pessoas que sofrem com doenças como diabetes, depressão e ansiedade está cada vez maior. Complicações do DM como a dor neuropática diabética, depressão e ansiedade podem afetar profundamente a qualidade de vida do indivíduo. Modelos animais são amplamente utilizados para o estudo do DM e suas complicações. Clinicamente, o DM 2 é o mais prevalente, representando 90% a 95% de todos os pacientes diabéticos. A caracterização de um modelo animal de DM 2 é amplamente desejada e, para esta finalidade, existem camundongos e ratos geneticamente modificados, suplementação alimentar com dieta hiperlipídica ou rica em frutose e também a associação entre baixa dose de estreptozotocina (STZ) e nicotinamida (NA; CHAO et al., 2018). Entre essas opções, o modelo de DM2 induzido por associação STZ-NA torna-se o mais viável financeiramente e que apresenta menor tempo de desenvolvimento da doença. Neste modelo, uma baixa dose de STZ é utilizada para mimetizar a perda parcial de massa de células  $\beta$ -pancreáticas observada no DM2. Por outro lado, a nicotinamida é aplicada no sentido de proteção da células  $\beta$ -pancreáticas contra a ação da STZ, efeito este dependente da preservação do *pool* de NAD intracelular realizado por este composto uma vez que a NA é um precursor direto de NAD, e também, um inibidor da poli (ADP-ribose) sintetase, uma enzima que consome NAD ativada pela lesão do DNA induzida pela STZ (MASIELLO et al., 1998). Considerando os benefícios do uso desse modelo e a falta de estudos avaliando dor neuropática e parâmetros comportamentais de ansiedade e depressão em animais diabéticos induzidos através da associação dessas drogas, torna-se interessante a investigação através do presente projeto.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 2, induzido pela associação de baixa dose de estreptozotocina (STZ) e nicotinamida (NA), avaliando parâmetros comportamentais de alodinia mecânica, depressão e ansiedade.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial desenvolvimento de DM2 ou estado pré-diabético após a administração de STZ-NA;
- Avaliar o decurso temporal do estabelecimento da alodinia mecânica em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por STZ-NA;
- Avaliar o comportamento do tipo-ansioso através do teste de labirinto em cruz elevado em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por STZ-NA;
- Avaliar comportamento tipo-depressivo através do teste de natação forçada modificado em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por STZ-NA;
- Avaliar a atividade locomotora dos animais através do teste de campo aberto em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por STZ-NA;
- Avaliar a resposta a glicose através do teste de tolerância a glicose em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por STZ-NA.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DIABETES TIPO 2

A prevalência global de diabetes *mellitus* está aumentando rapidamente como resultado do envelhecimento da população, da urbanização e das mudanças associadas ao estilo de vida. O número de pessoas com DM em todo o mundo mais do que dobrou nas últimas três décadas. Em 2010, cerca de 285 milhões de pessoas em todo o mundo apresentavam diabetes *mellitus*, 90% das quais tinham DM2 (CHEN; MAGLIANO; ZIMMET, 2011). Acredita-se geralmente que uma dieta de estilo ocidental, densa em energia, em conjunto com um estilo de vida sedentário, é a principal causa do DM2. Esses dois fatores também são considerados responsáveis pela atual epidemia global de obesidade, que está intimamente associada à taxa crescente de DM2. Alguns estudos demonstraram que além do sedentarismo e obesidade, vários outros fatores podem contribuir para o desenvolvimento de DM2, como má qualidade de sono, ingestão de álcool, exposição passiva a fumaça do cigarro, estresse, depressão e ansiedade e fatores genéticos (KOLB; MARTIN, 2017).

Os pacientes com DM2 manifestam múltiplos distúrbios na homeostase da glicose, incluindo: (1) secreção deficiente de insulina; (2) resistência à insulina no músculo, fígado e adipócitos; e (3) anormalidades na captação de glicose esplênica (DEFRONZO, 2004). A insulina é o principal hormônio para a regulação da glicose no sangue e, geralmente, a normoglicemia é mantida pela interação equilibrada entre a ação da insulina e a secreção de insulina. É importante ressaltar que a célula  $\beta$ -pancreática normal pode se adaptar às mudanças na ação da insulina – isto é, uma diminuição na ação da insulina é acompanhada pela regulação positiva da secreção de insulina, e vice-versa. Quando a ação da insulina diminui (como no aumento da obesidade), o sistema geralmente compensa aumentando a função das células  $\beta$ . No entanto, ao mesmo tempo, as concentrações de glicose no sangue em jejum e 2h após a carga de glicose aumentará levemente. Esse aumento pode muito bem ser pequeno, mas com o passar do tempo torna-se prejudicial devido à toxicidade da glicose e, por si só, causa de disfunção das células  $\beta$ . A resistência à insulina é dita presente quando os efeitos biológicos da insulina são

menores do que os esperados para o descarte de glicose no músculo esquelético e a supressão da produção de glicose endógena principalmente no fígado. Assim, mesmo com reserva de células  $\beta$  (teoricamente) ilimitada, a resistência à insulina abre caminho para hiperglicemia e DM2. (STUMVOLL; GOLDSTEIN; HAEFTEN, 2010) Todos esses fatores contribuem para as complicações microvasculares e macrovasculares do DM o que faz com que exista uma busca incessante de tratamentos eficazes.

As escolhas terapêuticas para o manejo do DM2 devem visar a melhora da sensibilidade à insulina tecidual. Essas escolhas são primariamente intervenção no estilo de vida, com exercícios, dieta balanceada e perda de peso. Fármacos que melhoram a sensibilidade a insulina são os da classe das tiazolinedionas, metformina, inibidores da  $\alpha$ -glucosidase e derivados de sulfonilureia (STUMVOLL; GOLDSTEIN; HAEFTEN, 2010).

## 2.2 DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Muitas pessoas relatam dor na ausência de dano tecidual ou qualquer provável causa fisiopatológica, e geralmente não há como distinguir sua experiência daquela devido a dano tecidual. Assim, a dor tem várias dimensões importantes: uma dimensão sensorial – onde dói e quanto dói; uma dimensão emocional - quão desagradável é a experiência; e uma dimensão cognitiva - como interpretamos a dor com base em nossa experiência anterior, se ela causa medo e ansiedade, e como respondemos à ameaça representada pela dor (CROFFORD, 2015).

A dor pode ser aguda (duração inferior a 30 dias) ou crônica (duração superior a 30 dias), sendo classificada segundo seu mecanismo fisiopatológico em três tipos: a) dor de predomínio nociceptivo, esta tem um caráter protetor, b) dor de predomínio neuropático e c) dor mista. A dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, sendo melhor compreendida como resultado da ativação anormal da via da dor ou nociceptiva. Existem várias causas que levam ao desenvolvimento da dor neuropática, como

infecção por herpes zoster, infecção por HIV, alcoolismo, acidente vascular encefálico, câncer e diabetes. As causas mais comuns de neuropatia periférica nos EUA e na Europa são pré-diabetes e DM2 (FELDMAN et al., 2018).

A neuropatia diabética é primariamente um distúrbio dos nervos sensoriais, e no início do curso de pacientes com neuropatia diabética comumente experimentam sintomas sensoriais positivos nos pés, como dor, formigamento e sensação de formigamento (parestésias), bem como sintomas negativos, como dormência. O processamento sensorial desordenado pode evocar a dor quando os pés são tocados (alodinia) e aumentar a sensibilidade a estímulos nocivos (hiperalgesia). Só muito mais tarde no curso da doença há evidência de disfunção do nervo motor, com fraqueza distal dos dedos ou, em casos extremos, tornozelos e panturrilhas (FELDMAN et al., 2018). As neuropatias são as complicações mais comuns a longo prazo do diabetes e embora pacientes diabéticos possam manifestar diversas formas de neuropatia, aproximadamente metade dos pacientes apresentam a polineuropatia distal simétrica (PDS) (RUSSELL; ZILLIOX, 2014). A PDS dolorosa é caracteristicamente mais grave à noite e frequentemente interfere no sono normal. Esse tipo de neuropatia está associada a uma qualidade de vida prejudicada, morbidade significativa, quadro de ansiedade, depressão e aumento dos custos com a saúde (TESFAYE; BOULTON; DICKENSON, 2013; JAVED et al., 2015).

A fisiopatologia da neuropatia diabética ainda não está bem estabelecida, mas existem algumas teorias que tentam explicar os mecanismos que levam ao desenvolvimento da doença. Alguns estudos buscam explicar a disfunção do nervo e a morte celular na neuropatia diabética através de uma miríade complexa de eventos que são desencadeados pelos desequilíbrios metabólicos associados ao diabetes. A hiperglicemia, a dislipidemia e/ou a resistência a insulina promovem a ativação da proteína quinase C (PKC), poli(ol), produtos finais de glicação avançada (AGE), poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) e hexosamina, bem como a perda de sinalização de insulina, que culminam em efeitos deletérios sobre a função mitocondrial e expressão gênica, juntamente com inflamação e estresse oxidativo (Feldman, et al., 2018).

A via mais estudada que se acredita ser a base da neuropatia diabética é a via do poli(ol). Nesta via o excesso de glicose é convertido em sorbitol pela

aldose redutase; isso resulta em desequilíbrio osmótico na célula devido ao aumento de sorbitol, com resultante estresse osmótico e efluxo compensatório de mioinositol e taurina. Por sua vez, a perda de mioinositol, um componente essencial da bomba ATPase de sódio/potássio (Na/K), prejudica atividade dessa bomba, levando ao acúmulo de sódio intracelular e alterações no estado de repouso da membrana. O resultado é a alteração da fisiologia normal do nervo, como a diminuição da velocidade de condução neural. Uma consequência da hiperatividade da via do poliol é a hipótese do fluxo metabólico. A aldose redutase depleta os estoques dos cofatores NADPH e NAD<sup>+</sup>, necessários para gerar o óxido nítrico (NO) e regenerar a glutathione, principal antioxidante do organismo, ocorrendo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e um prejuízo no suprimento de sangue para o nervo (revisado em FELDMAN et al., 2018).

A sensibilização periférica e sensibilização central também são dois mecanismos estudados que contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática diabética. Após uma lesão do nervo por estado de hiperglicemia, por exemplo, vários fatores podem contribuir para a sensibilização periférica, como os mediadores inflamatórios, por exemplo, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e a substância P, liberados dos terminais nociceptivos, aumentam a permeabilidade vascular, levando ao edema localizado e ao escape dos subprodutos da lesão, como prostaglandinas, bradicinina, fatores de crescimento e citocinas. Estas substâncias podem sensibilizar bem como excitar os nociceptores, resultando em limiares de disparo reduzidos e descargas ectópicas. Um contribuinte para o disparo espontâneo de fibras nervosas (descargas ectópicas) após a lesão é o aumento da expressão dos canais de sódio nos gânglios da raiz dorsal e ao redor do local da lesão terminal (neuroma) dos axônios lesados. A proliferação de canais de sódio, pode diminuir o limiar de estimulação e provocar descarga ectópica, resultando em dor espontânea. Além disso, a disseminação dos canais de sódio pode desencadear a sensibilização central (COHEN; MAO, 2014).

Quando os neurônios da medula espinhal do corno dorsal estão sujeitos à sensibilização central, eles exibem alguns ou todos os seguintes fatores: desenvolvimento ou aumento da atividade espontânea, redução do limiar de ativação por estímulos periféricos, aumento das respostas à estimulação supra-

limiar e ampliação de seus campos receptivos (LATREMOLIERE; WOOLF., 2009). A sensibilização central se inicia por um estímulo doloroso crônico que ativa as fibras C, provocando o aumento da liberação de glutamato, substância P e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em terminais nervosos centrais. Isto resulta na ativação de receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) e alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), mas também receptores ligados a tirosina quinase, os quais aumentam a atividade de um grupo de moléculas sinalizadoras que alteram a expressão de genes, resultando em mudanças neuroquímicas (neuroplasticidade) na medula espinhal, o que faz com que todos os estímulos resultem em dor (MOALEM; TRACEY, 2006; MUIR, 2009).

Existem vários medicamentos para o tratamento da dor, como antidepressivos, anticonvulsivantes, agentes tópicos e opioides, que são utilizados por pessoas com neuropatia periférica diabética. No entanto, devido aos efeitos colaterais comuns, os pacientes apresentam uma baixa adesão aos tratamentos e além disso uma baixa responsividade, uma vez que somente 1/3 dos pacientes apresentam alívio de 50% da dor, valor que é considerado para determinar se o tratamento da DND foi bem-sucedido ou não. É uma tarefa desafiadora para os médicos encontrar uma terapia adequada para pessoas com neuropatia periférica diabética. Por isso se torna tão importante o estudo da fisiopatologia da doença e a busca de novas terapias (ÇAKICI et al., 2016; HUIZINGA; PELTIER, 2007).

### 2.3. DEPRESSÃO E ANSIEDADE ASSOCIADAS AO DIABETES

A depressão é caracterizada pelo humor depressivo, anedonia, energia reduzida, sentimento de culpa ou baixa autoestima, alterações do sono ou do apetite e falta de concentração. Depressão e DM2 são duas das principais causas globais de morbidade e mortalidade, com DM2 afetando atualmente mais de 9% e depressão que afeta 5% da população mundial. De quatro pacientes com DM2, pelo menos um apresenta uma forma clinicamente significativa de depressão, com uma prevalência cinco vezes maior do que a observada na população geral. Indivíduos com diabetes podem ser particularmente vulneráveis aos efeitos deletérios dos sintomas afetivos. A depressão maior é uma condição

que, rotineiramente, apresenta sintomas concomitantes de ansiedade – entre 50 e 75% dos indivíduos diagnosticados com depressão maior em ambientes de atenção primária também são diagnosticados com um transtorno de ansiedade comórbido (NAICKER et al., 2018). Um estudo de Bruce e colaboradores (2016), mostrou que é comum que ansiedade e depressão estejam presentes juntas em pacientes diabéticos, formando o que pode ser descrito como depressão ansiosa. Há evidências crescentes de que os processos psicossomáticos contribuem para uma variedade de desfechos do DM2, e a depressão tem demonstrado influenciar o manejo e o prognóstico do DM2 por meio de efeitos adversos em fatores como controle glicêmico, comportamentos de autocuidado e índice de massa corporal. Em consonância com isso, a presença de depressão comórbida em pacientes com diabetes muitas vezes leva ao aumento dos custos de cuidados de saúde, maiores riscos de complicações vasculares e taxas de mortalidade excessiva (NAICKER et al., 2017).

Estudos mostram que a dor é um sintoma frequente em pessoas acometidas pela depressão e ansiedade, e é uma das manifestações mais comuns em pacientes diabéticos. A associação entre dor crônica, depressão e ansiedade ganhou particular atenção devido às altas taxas de comorbidade. Até 54% dos pacientes com dor foram relatados como portadores de depressão comórbida, e até 50% foram relatados como portadores de ansiedade. (FEINGOLD et al., 2017; ELBINOUNE et al., 2016)

Alguns estudos sugerem que a presença de ansiedade e/ou depressão leva a resultados piores para complicações micro e macrovasculares do diabetes. Além disso, complicações associadas ao diabetes podem levar ao desenvolvimento de depressão e ansiedade pelo fato de dificultar tarefas diárias do indivíduo portador da doença (BAIR, 2010; JAIN et al., 2011).

Em termos da história natural do diabetes tipo 2, alguns estudos prospectivos mostraram que a depressão está associada à resistência tardia à insulina. Mecanismos comuns entre diabetes e depressão incluem a ativação crônica da imunidade inata, o eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Adrenal (HPA) e os ritmos circadianos. A depressão está associada à desregulação crônica do eixo HPA. O excesso de cortisol dificulta a neurogênese no hipocampo, uma região implicada na depressão e no DM2 e também pode levar ao aumento dos ácidos graxos livres circulantes que podem prejudicar a função da insulina. Além disso,

o cortisol estimula o sistema nervoso simpático de forma a contribuir e/ou exacerbar o aparecimento da ansiedade. Esses fatores estão, portanto, no caminho causal da disfunção metabólica, resistência à insulina e do DM2 (PETRAK; ROHRIG; ISMAIL, 2018).

Muitas hipóteses foram propostas para explicar ou compreender a neurobiologia da depressão. Por exemplo, a hipótese da deficiência de monoaminas propõe que a base biológica subjacente para a depressão é uma deficiência de sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos e/ou dopaminérgicos centrais. Além disso, alguns estudos também implicam o envolvimento de outros neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e/ou glutamato. Alguns estudos demonstraram que em comparação com controles psiquiatricamente saudáveis, indivíduos com depressão tinham densidades reduzidas de neurônios GABAérgicos no córtex pré-frontal e occipital. Uma desregulação nos sistemas centrais de neurotransmissores também é observada na condição diabética, e o triptofano plasmático, o precursor da serotonina, está significativamente diminuído em pacientes deprimidos e também em pacientes diabéticos. Além disso, animais diabéticos exibiram alterações nos níveis de serotonina, comparados com os ratos controle normoglicêmicos, os níveis de serotonina foram diminuídos no tálamo/hipotálamo, cerebelo e tronco encefálico (ZANOVELI et al., 2016).

## 2.4. MECANISMO DE AÇÃO DA NICOTINAMIDA E ESTREPTOZOTOCINA

A estreptozotocina é uma glicosamina-nitrosureia, sintetizada por *Streptomyces achromogenes* e é utilizada comumente para indução do DM tipo 1 (figura 1). Geralmente é utilizada uma dose única (60 mg/kg) de STZ, via intraperitoneal em ratos para o desenvolvimento da doença. A ação da estreptozotocina prejudica a oxidação da glicose e diminui a biossíntese e a secreção de insulina, alterando suas concentrações sanguíneas. Essas mudanças nas concentrações de glicose e insulina no sangue refletem anormalidades na função das células  $\beta$ . A droga é captada pelas células pancreáticas através de transportadores de glicose GLUT-2.

Alguns mecanismos são propostos para a citotoxicidade produzida pela STZ. A alquilação do DNA celular e subsequente ativação da poli-ADP ribose sintetase causam depleção rápida e letal de NAD nas células pancreáticas, com subsequente redução no nível de ATP e posterior inibição da síntese e secreção da insulina. Além disso, como a STZ é um doador de óxido nítrico (NO) e o NO provoca a destruição das ilhotas pancreáticas, propõe-se que essa molécula contribui para o dano ao DNA induzido pela STZ. Também foi constatado que STZ gera espécies reativas de oxigênio, que também contribuem para a fragmentação do DNA e evocam outras alterações deletérias nas células. A formação de ânions superóxido resulta tanto da ação da STZ nas mitocôndrias quanto do aumento da atividade da xantina oxidase. Foi demonstrado que a STZ inibe o ciclo de Krebs e diminui substancialmente o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias. Esses efeitos limitam fortemente a produção de ATP mitocondrial e causam depleção desse nucleotídeo em células  $\beta$ -pancreáticas.

Pode-se afirmar que as propriedades alquilantes de STZ são a razão principal da sua toxicidade. No entanto, a ação sinérgica do NO e das ROS também pode contribuir para a fragmentação do DNA e outras alterações deletérias causadas pela STZ. Portanto, os antioxidantes intracelulares ou os eliminadores de NO atenuam substancialmente a toxicidade de STZ (SILVA et al., 2011; SZKUDELSKI, 2001).

A nicotinamida piridina-3-carboxamida (NA) é a forma amida da vitamina B3 (niacina) (figura 1). A ação protetora da NA contra o dano celular induzido por diferentes agentes nocivos está bem estabelecida na literatura. Alguns estudos

já demonstraram que a NA é capaz de proteger as células  $\beta$ -pancreáticas contra a toxicidade da STZ, atenuando o efeito da redução de biossíntese de pró-insulina causado por STZ, melhorando o efeito inibitório da STZ na secreção de insulina, diminuição no dano ao DNA, entre outros efeitos. Dados da literatura permitem concluir que o mecanismo da ação protetora da NA contra o dano das células  $\beta$ -pancreáticas induzido por STZ envolve dois efeitos principais: inibição da poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) e provisão de  $\text{NAD}^+$ .

A estrutura da PARP-1 consiste em três domínios principais: um domínio de ligação ao DNA N-terminal, um domínio de auto modificação e uma região C-terminal. Uma região C-terminal catalisa a síntese de poli (ADP-ribose) e liga-se a proteínas alvo. Este sítio ativo da PARP-1 é dividido em um aceitador e um sítio doador. A área doadora é ocupada por  $\text{NAD}^+$ , e é adicionalmente dividida em três sub sítios: um sítio de ligação à nicotinamida-ribose, um local de ligação ao fosfato e um sítio de ligação à adenina-ribose. Foi demonstrado que a inibição de PARP-1 resulta da interação de NA com o sítio de ligação para a porção NA de NAD. A NA entra em associações de hidrogênio ligado a Ser (904) e Glicina (863) no sítio de ligação de nicotinamida-ribose do sítio ativo de PARP-1. A inibição de PARP-1 pela NA é de natureza competitiva, uma vez que NA bloqueia a ligação de  $\text{NAD}^+$  ao domínio catalítico da enzima.

Além da inibição da PARP-1, pensa-se que a ação protetora da NA contra o dano celular induzido pela STZ resulta do fornecimento de  $\text{NAD}^+$ . Foi demonstrado que a administração de NA em animais aumenta o conteúdo de  $\text{NAD}^+$  em diferentes tecidos. Além disso, o NA aumenta o  $\text{NAD}^+$  intracelular e previne a depleção de  $\text{NAD}^+$  sob diferentes condições patológicas. Esse efeito é devido à redução na utilização do  $\text{NAD}^+$  e/ou aumento da sua biossíntese. Em mamíferos, o  $\text{NAD}^+$  é sintetizado principalmente a partir de NA e sua formação é catalisada por duas enzimas - nicotinamida fosforilribosiltransferase (Nampt) e nicotinamida/ ácido nicotínico mononucleotídeo adeniltransferase (Nmnat). No primeiro passo da geração de  $\text{NAD}^+$  catalisada por Nampt, NA e 5-fosforilribosilpirofosfato (PRPP) são convertidos em mononucleótido de nicotinamida (NMN). Então, NMN sofre transformação para NAD em uma reação catalisada por Nmnat. A atividade do Nampt nas células  $\beta$  é supostamente baixa. No entanto, o Nampt atua como uma enzima intracelular (iNampt) e extracelular

(eNampt) e, no caso de chamadas com baixa atividade de iNampt, a maioria dos NMN utilizados para formar NAD<sup>+</sup> é gerada de forma extracelular (SZKUDELSKI, 2012).

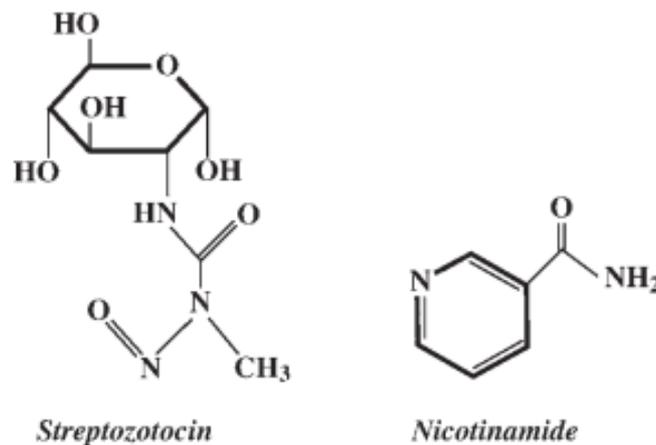


Figura 1: Estrutura química da estreptozotocina e da nicotinamida. Fonte: Szkudelski, 2012.

A administração de STZ e NA a ratos adultos causa destruição parcial das células  $\beta$ , levando a uma diminuição da insulina e um aumento da glicemia nestes animais. A gravidade do DM induzido por STZ e NA é muito menor do que o DM induzido apenas por STZ. Os ratos manifestam hiperglicemia moderada e não requerem insulina exógena para sobreviver. A resposta secretora de insulina à glicose no DM induzido por STZ-NA é prejudicada, particularmente em altas concentrações de glicose e a segunda fase da secreção de insulina induzida por glicose é insuficiente. O comprometimento da secreção de insulina estimulada pela glicose resulta tanto de uma massa reduzida de células  $\beta$  como de alguns defeitos nas células existentes. O DM induzido por STZ e NA permanece estável por um longo tempo e, portanto, este modelo de DM é adequado não apenas para estudos em animais a curto prazo, mas também a longo prazo. Além disso, este modelo é muito útil em estudos de diferentes aspectos do diabetes, incluindo complicações diabéticas e propriedades anti-diabéticas de novos medicamentos e alguns compostos naturais (SZKUDELSKI, 2012).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados de 45 ratos machos da variedade *Wistar*, pesando de 200 a 250g, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Paraná localizado no Setor de Ciências Biológicas. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Os animais diabéticos foram alojados em número reduzido por caixa (4 animais), enquanto os animais não diabéticos foram alojados em grupos de 5 por caixa, com maravalha trocada três vezes por semana. Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com as normas e legislações estabelecidas pela Comissão de Ética no uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

#### 3.2 INDUÇÃO AO DIABETES EXPERIMENTAL

O modelo de diabetes foi induzido em animais pesando entre 200-250g, após um jejum de 12 horas, por meio de uma injeção única, via intraperitoneal (i.p) de estreptozotocina (STZ; Sigma-Aldrich), diluída em tampão citrato (10 mM, pH 4,5) na dose de 45 mg/kg (grupos PD-45+VEI; PD-45+MET,) ou 55 mg/kg (grupos PD-55+VEI; PD-55+MET) 15 minutos após a administração i.p. de nicotinamida (110 mg/kg- grupo PD-45 ou 100 mg/kg-grupo PD-55); diluída em salina) segundo modelo modificado já descrito por Massiello e colaboradores (1998). Os animais normoglicêmicos (NGL+VEI) receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) do veículo (tampão citrato, 10 mM, pH 4,5). O diabetes foi confirmado 72 horas após a injeção de STZ-NA. Para isso, amostras de aproximadamente 5 µl de sangue da veia caudal foram adicionadas a fitas teste impregnadas de glicose oxidase (Accu-Check Active™, Roche) e analisadas através do glicosímetro digital (Accu-Check Active™, Roche). Todos os animais foram mantidos até o final dos experimentos para avaliação de todos os parâmetros. Animais normoglicêmicos, que receberam apenas o veículo (tampão citrato), foram usados como controle.

### 3.3 TRATAMENTO

Após a confirmação do estado diabético, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais de 7 a 10 animais: pré-diabéticos tratados por via oral com veículo (água; PD-45+VEI; PD-55+VEI) ou com metformina (25 mg/kg; por via oral; grupos PD-45+MET; PD-55+VEI; segundo YANARDAG et al., 2005). Os tratamentos foram iniciados no 7º dia após a administração de STZ-NA (considerado como dia 1 (D-1), e continuados por 25 dias consecutivos, portanto do dia 7 (D-7) ao (D-32). Animais Normoglicêmicos tratados oralmente com veículo (água; NGL+VEI, do D-7 ao D-32) foram conduzidos em paralelo como grupo controle.

### 3.4 VON FREY ELETRÔNICO

A resposta ao estímulo mecânico foi avaliada por meio do teste de pressão crescente no pé de ratos (Von Frey eletrônico) (DEUIS; DEVORAKOVA; VETTER, 2017), mensurado por um analgesímetro eletrônico (INSIGHT Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O aparelho possui um transdutor de força conectado a um contador digital onde a força aplicada é expressa em gramas (g). O contato do transdutor de força com o pé é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico para ambientação por 15 min. Após a ambientação, foi aplicada uma força linearmente crescente no centro da região plantar dos pés do animal. O estímulo foi cessado quando o animal produzir uma resposta de retirada e sacudida da pata estimulada. A intensidade da alodinia mecânica foi, então, quantificada e expressa como a média dos três valores obtidos em cada pata. Esse teste foi realizado antes da administração de STZ-NA (estado basal) e nos D-7, D-14, D-21, D-28 após a indução ao diabetes.

### 3.5 CAMPO ABERTO

Para avaliação do desempenho motor dos animais, evitando mascarar o possível efeito antinociceptivo, os animais foram testados no campo aberto (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009), que consiste em uma caixa retangular (40 x 50 x 63 cm) que tem sua base dividida em 9 unidades quadrangulares. Os animais foram colocados no quadrante central do campo aberto e exploraram livremente a área por 5 minutos. Foi quantificado o número de cruzamentos com os quatro membros (mãos e pés) entre os quadrantes.

### 3.6 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O comportamento tipo-ansioso dos animais foi avaliado através dos teste do labirinto em cruz elevado (HANDLEY; MITHANI, 1984), que consiste em um aparato contendo 2 braços opostos abertos e 2 braços opostos fechados (45 x 15cm) conectados por uma área central (15 x 15 cm) e elevado a uma distância de 70 cm acima do chão. Os ratos foram colocados na área central, voltados para um dos braços abertos e foi mensurado o número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados. Depois de testar cada animal, o aparato foi higienizado com uma solução de álcool etílico 10% para evitar que o odor do animal anterior interferisse no comportamento.

### 3.7 NADO FORÇADO

Para avaliar o comportamento do tipo-depressivo, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977), que consiste em 2 sessões. Na primeira sessão, o pré-teste, eles foram colocados individualmente para nadar durante 15 minutos em um cilindro de PVC (30 cm x 40 cm de altura) contendo 25cm de água a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Na segunda sessão, realizada 24 horas depois, os ratos foram submetidos a 5 minutos do nado forçado e a resposta foi gravada através de uma câmera de vídeo para posterior análise do comportamento. Foi quantificado o tempo de primeira imobilidade e tempo total de imobilidade. Entre as sessões, a água do cilindro foi trocada a fim de evitar interferência entre os animais testados.

### 3.8 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE

No dia 32 após um jejum de 12-16 horas, foi administrado por via oral uma solução de glicose a 50% (2 g/kg de peso corporal, dissolvido em água). A glicemia foi aferida antes e novamente 30, 60, 90 e 120 minutos após o desafio oral com glicose para caracterização da curva glicêmica e a potencial tolerância à glicose (MORRIS et al., 2008; MUNIYAPPA et al., 2008)

### 3.9 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Todos os procedimentos experimentais estão representados na figura 2. Resumidamente, os animais foram retirados do biotério central e ficaram mantidos no biotério do laboratório de farmacologia da dor durante dois dias para ambientação. Os valores basais de limiar de resposta ao estímulo mecânico foram aferidos através do teste de Von Frey eletrônico (medida basal). Após um jejum de 12 horas, os animais normoglicêmicos receberam injeção i.p de tampão citrato e os animais diabéticos receberam injeção i.p de STZ (45 ou 55 mg/kg), 15 minutos depois da injeção i.p de NA (110 ou 100 mg/kg, respectivamente). A confirmação do diabetes foi realizada três dias depois. Os animais diabéticos foram tratados diariamente com veículo ou metformina (25 mg/kg, por via oral; YANARDAG et al., 2005) a partir do D-7 enquanto os animais normoglicêmicos (NGL+VEI) foram tratados com água também a partir o D-7. Este tratamento foi continuado por 25 dias consecutivos, isto é, de D-7 a D-32 do desenho experimental.

No D-7, antes de dar início ao tratamento, todos os grupos foram pesados e posteriormente foram testados novamente quanto a sensibilidades ao estímulo mecânico através do teste de Von Frey eletrônico. Essas medidas foram repetidas nos D-14, D-21, e D-28. Ademais, uma vez que já foi previamente demonstrado que os comportamentos do tipo-depressivo e tipo-ansioso têm início na quarta semana após indução do diabetes em modelo de diabetes tipo 1 induzido por STZ (Morais et al., 2014), os testes para avaliar as manifestações de ansiedade (labirinto em cruz elevado) e de depressão (nado forçado) foram

realizados no, D-29, D-30 e D31. O teste de campo aberto foi realizado antes da sessão teste do nado forçado.

No dia 32 após um jejum de 12-16 horas, foi administrado glicose a 50% (2g/kg de peso corporal, dissolvido em água via oral) e amostras de sangue foram coletadas da cauda antes e novamente aos 30, 60, 90 e 120 minutos para a realização do teste de tolerância a glicose. A eutanásia dos animais foi realizada através de guilhotina sem anestesia para que não houvesse interferência no sistema nervoso central, após a eutanásia foram coletados fígado, pâncreas, medula óssea, córtex e hipocampo.

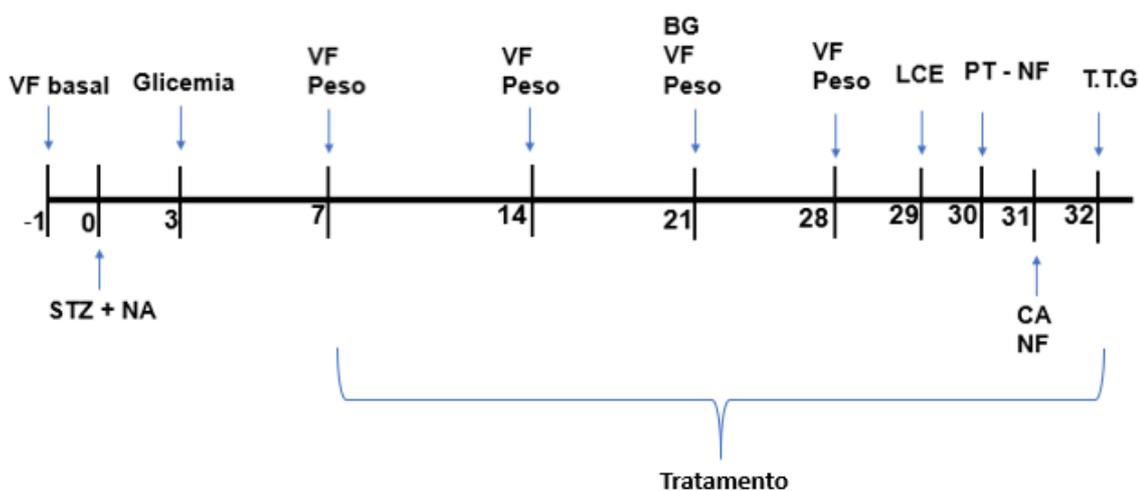


Figura 2: Delineamento experimental (VF = von Frey, CA = campo aberto, BG = glicose sanguínea, LCE = labirinto em cruz elevado, PT-NF = pré-teste nado forçado, NF = nado forçado, STZ = estreptozotocina, NA = nicotinamida, T.T.G = teste de tolerância a glicose). Fonte: Autor.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM de 7-10 animais por grupo experimental. Para a análise dos dados foi realizado ANOVA de uma via para os testes de nado forçada modificada, campo aberto e labirinto em cruz elevado. Para os testes Von Frey eletrônico, teste de tolerância a glicose, dados de glicemia e peso foi utilizado ANOVA de duas vias, ambos seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni. Em toda a análise o nível de significância foi de  $p \leq 0,05$  e o *software* utilizado foi o *GraphPad Prism 6.00* (San Diego, Califórnia)

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NOS NÍVEIS DE GLICOSE E PESO CORPORAL DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

ANOVA de duas vias indicou efeitos significativos de tratamento [ $F_{(2, 27)} = 6,284$ ,  $p < 0,05$ ] e tempo [ $F_{(1, 27)} = 20,0$ ,  $p < 0,001$ ] sobre a glicemia dos animais. O post hoc de Bonferroni indicou que houve aumento significativo na glicemia três dias após a injeção intraperitoneal de STZ-NA (em ambos os protocolos adotados; (figuras 3A; 4A) ( $p < 0,05$ ), os quais atingiram uma média de  $115,8 \pm 11,8$  g/dl (PD-45+VEI),  $108,0 \pm 10,8$  g/dl (PD-45+MET),  $169,1 \pm 75,4$  g/dl (PD-55+VEI) e  $160,3 \pm 76,7$  g/dl (PD-55+MET), enquanto que o grupo controle atingiu média de  $94,6 \pm 10,24$  g/dl.

Em relação ao peso dos animais no final dos experimentos (figuras 3B; 4B), ANOVA de uma via não indicou diferença entre os grupos.

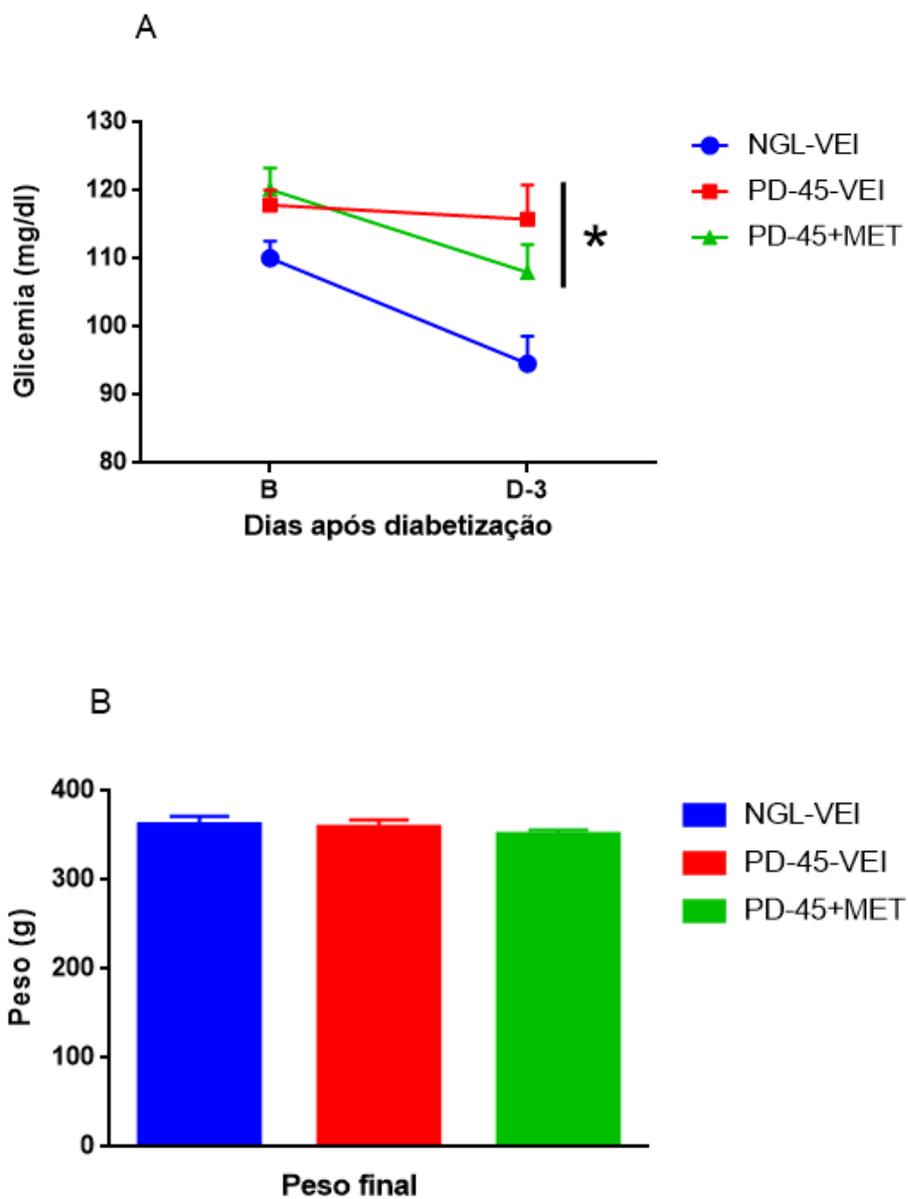


Figura 3 – Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida nos níveis de glicose (3A) e peso corporal (3B) dos animais pertencentes aos grupos PD-45+VEI e PD-45+MET. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  quando comparados ao grupo NGL+VEI.

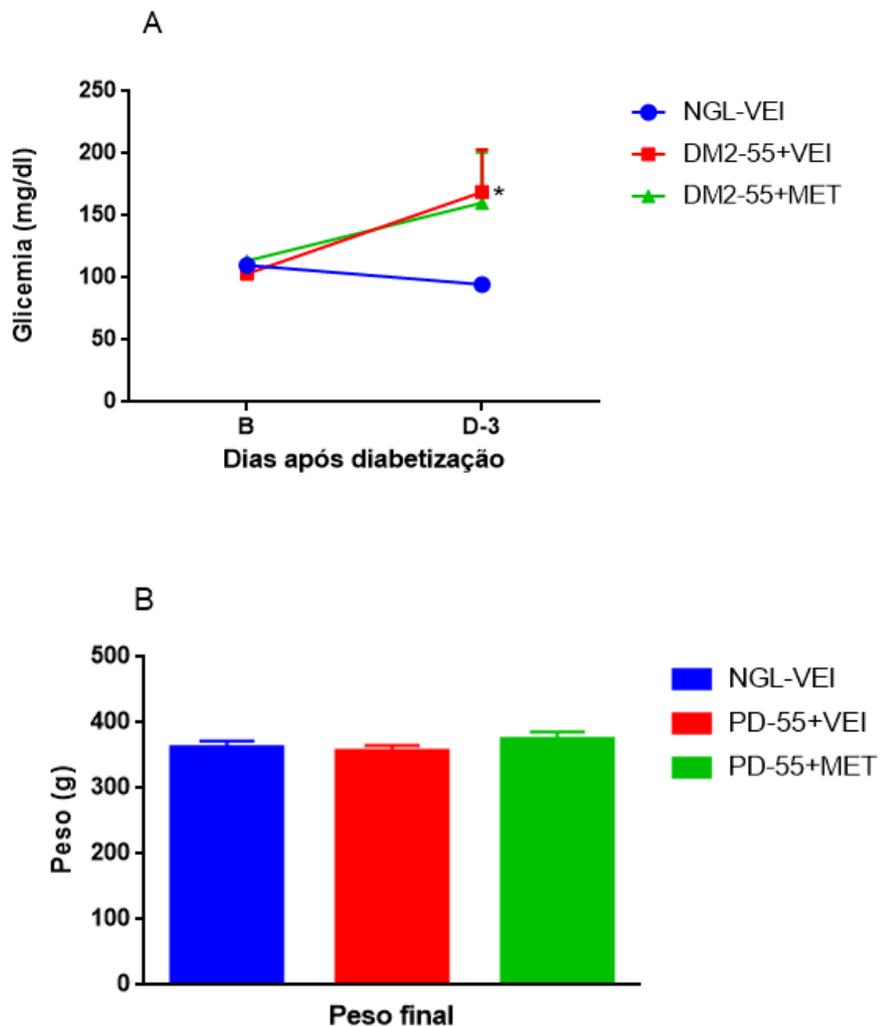


Figura 4 – Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida nos níveis de glicose (4A) e peso corporal (4B) dos animais pertencentes aos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  quando comparados ao grupo NGL+VEI.

#### 4.2. EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NA TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE DOS ANIMAIS

Para avaliar se os animais submetidos a injeção de STZ-NA estavam tolerantes a glicose, foi realizado o teste de tolerância a glicose (figura 5), o qual os animais foram submetidos a um desafio oral de glicose e a glicemia foi medida antes da ingestão e após 30, 60, 90 e 120 minutos. ANOVA de

duas vias não indicou diferença significativa entre os grupos em nenhum tempo medido ( $p > 0,05$ )

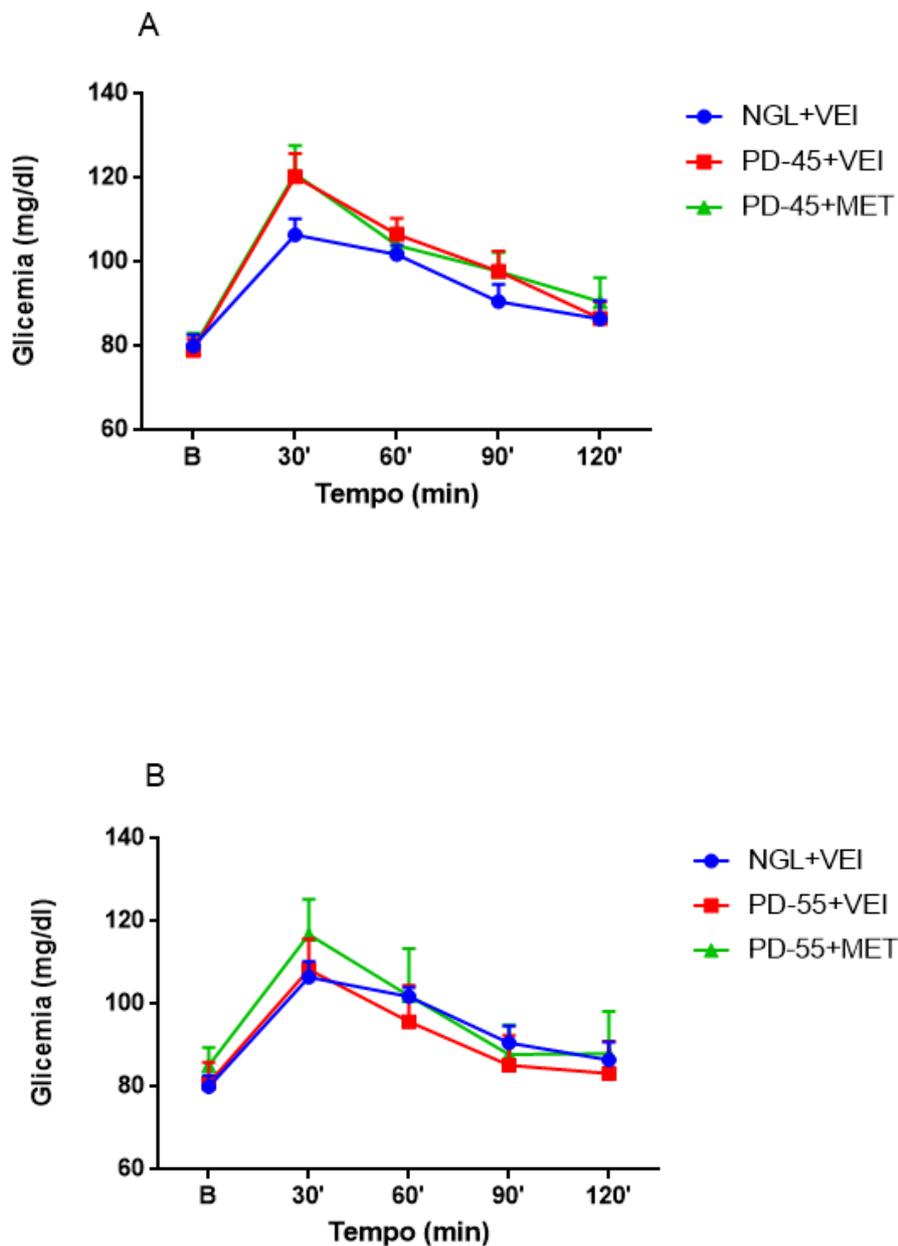


Figura 5: Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida sobre a resposta a glicose dos animais, avaliados pelo teste de tolerância a glicose via oral. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo NGL + VEI.

#### 4.3. EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NA ALODINIA MECÂNICA DOS ANIMAIS

O limiar mecânico dos animais foi medido antes da diabetização (limiar basal), no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a diabetização (figura 6A; 6B). ANOVA de duas vias demonstrou efeitos significativos de tratamento [ $F(2, 27) = 8,533, p < 0,05$ ] e tempo [ $F(4, 108) = 3,107, p < 0,05$ ] no limiar mecânico dos animais pertencentes aos grupos PD-45+VEI e PD-45+MET. Também demonstrou efeitos significativos de tratamento [ $F(2, 22) = 35,94, p < 0,001$ ], tempo [ $F(4, 88) = 12,20, p < 0,001$ ] e também uma interação entre esses fatores [ $F(8, 88) = 6,735, p < 0,001$ ] no limiar mecânico dos animais pertencentes aos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET. O post hoc de Bonferroni indicou que os animais pertencentes aos grupos (PD-45+VEI) tiveram uma diminuição do limiar mecânico no 7º e 28º dia após a diabetização quando comparados ao grupo controle (NGL+VEI). Já os animais pertencentes aos grupos (PD-55+VEI) tiveram uma diminuição do limiar mecânico a partir do 14º dia (3ª semana do experimento), indicando diferença significativa quando comparados aos animais normoglicêmicos do grupo controle. Em relação aos grupos experimentais tratados com metformina, os animais pertencentes ao grupo (PD-45+MET) não apresentaram diferença significativa no limiar mecânico em nenhum momento do experimento, enquanto que os animais do grupo (PD-55+MET) tiveram os seus limiares reduzidos sem diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo pré-diabético controle tratado com veículo.

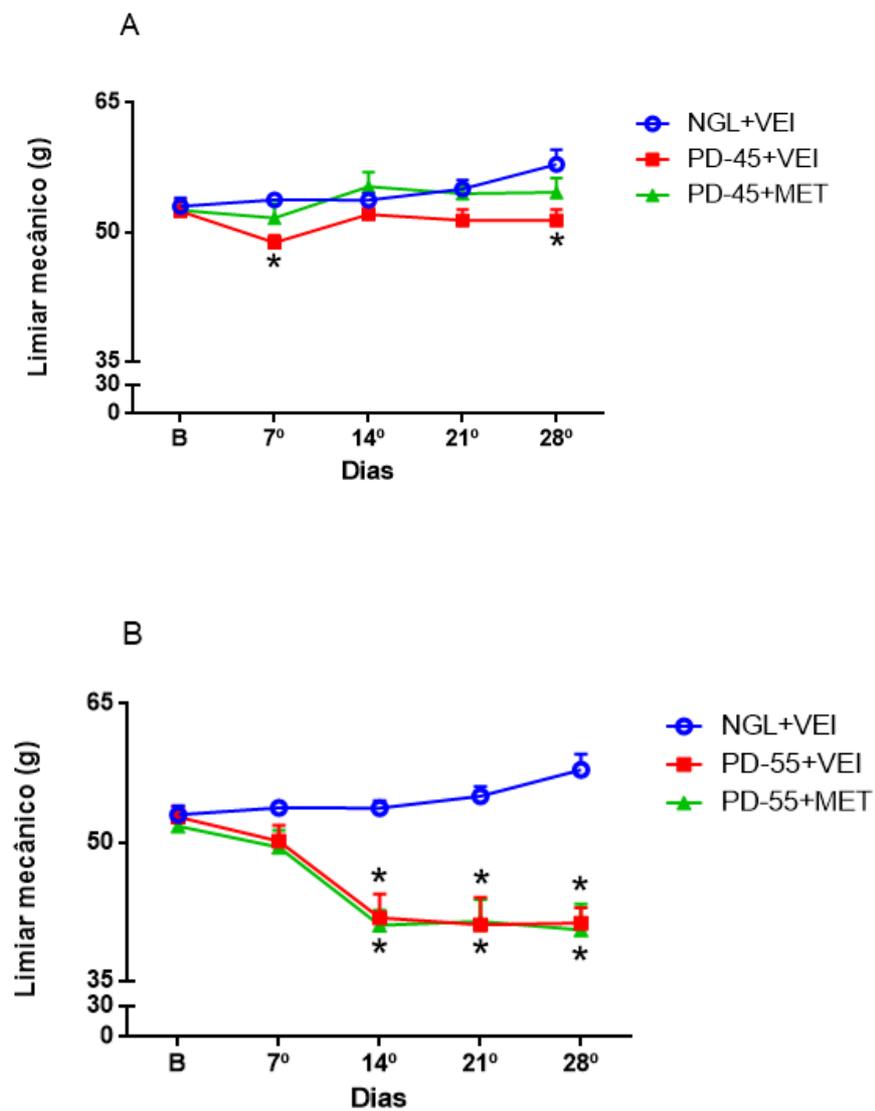


Figura 6 – Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida na alodinia mecânica (A; B) avaliada através do teste de VonFrey eletrônico. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  quando comparados ao grupo NGL+VEI.

#### 4.4. EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NO DESENVOLVIMENTO DE COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS

Para avaliar o efeito da injeção intraperitoneal da combinação STZ-NA sobre comportamento tipo depressivo dos animais foi realizado o teste de nado forçado e foram avaliados quanto ao tempo de imobilidade (figuras 7A; 8A) e quanto ao tempo de latência (figuras 7B; 8B). ANOVA de uma via indicou efeitos significativos de tratamento [ $F(2, 19) = 4,581, p < 0,05$ ] no tempo de imobilidade dos animais dos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET (figura 8A). O post-hoc de Bonferroni demonstrou que o grupo PD-55+VEI apresentou um tempo total de imobilidade menor quando comparados ao grupo controle. ANOVA de uma via não indicou efeitos significativos no tempo de imobilidade nos outros grupos testados. Em relação ao tempo de latência, ANOVA de uma via não demonstrou nenhuma diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Para avaliar algum efeito do tratamento na atividade locomotora dos animais, foi realizado o teste do campo aberto em todos os grupos experimentais no 31º dia de experimento (figuras 9A; 9B). ANOVA de uma via não revelou efeitos significativos na locomoção de animais quando comparados ao grupo controle ( $p > 0,05$ ).

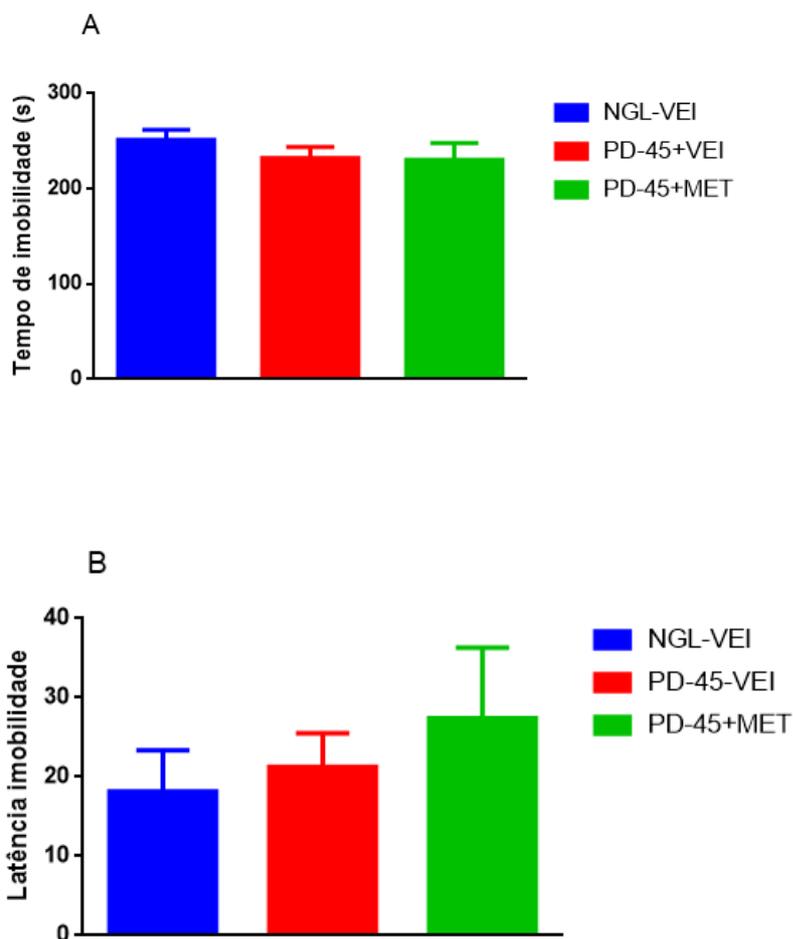


Figura 7 – Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida no comportamento tipo depressivo dos animais pertencentes aos grupos PD-45+VEI, PD-45+MET através da avaliação de tempo de imobilidade (A) e latência de imobilidade (B) no teste de nado forçado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo NGL+VEI.

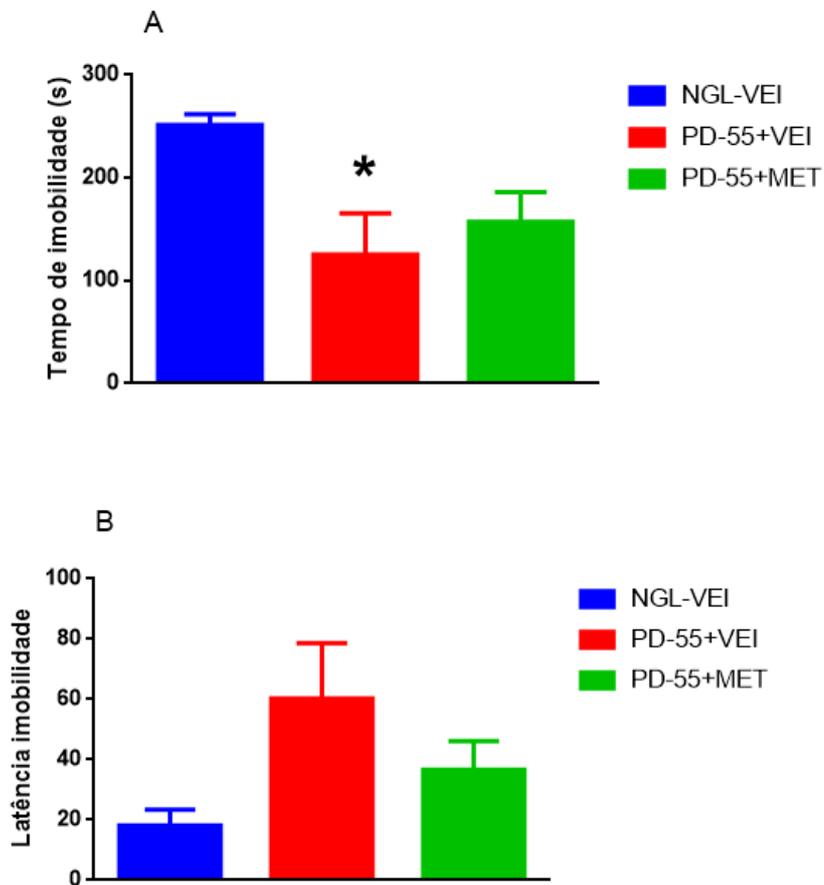


Figura 8 – Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida no comportamento tipo depressivo dos animais pertencentes aos grupos PD-55+VEI, PD-55+MET através da avaliação de tempo de imobilidade (C) e latência de imobilidade (D) no teste de nado forçado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo NGL+VEI.

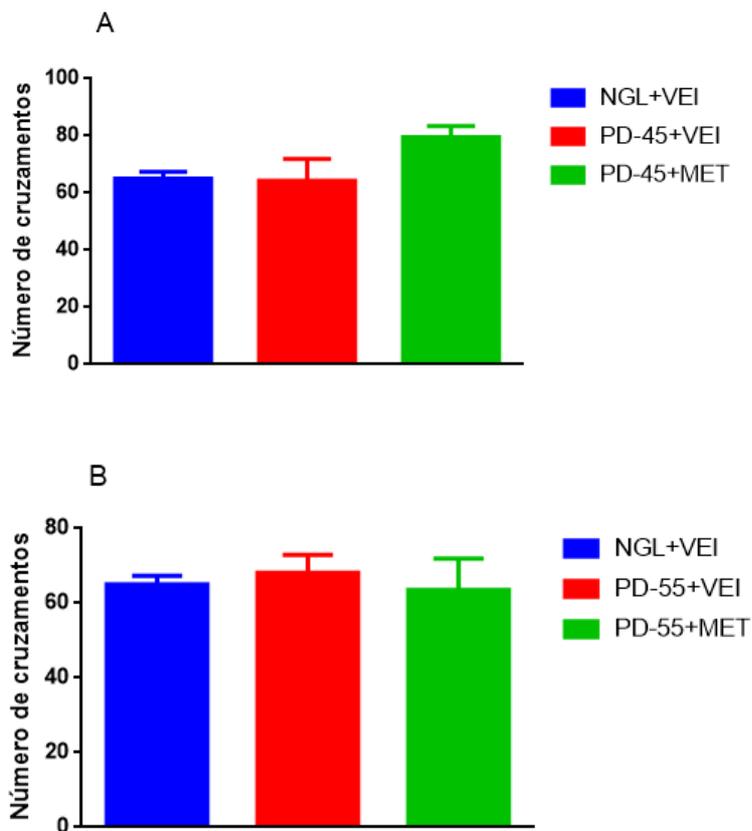


Figura 9 – Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida na atividade locomotora dos animais pertencentes aos grupos PD-45+VEI, PD-45+MET (A), PD-55+VEI e PD-55+MET (B) através da avaliação do número de cruzamento no teste campo aberto. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo NGL+VEI.

#### 4.5. EFEITO DA COMBINAÇÃO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA NO DESENVOLVIMENTO DE COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO DOS ANIMAIS

Para avaliar o efeito da injeção intraperitoneal da combinação de estreptozotocina-nicotinamida no comportamento tipo ansioso dos animais, foi realizado o teste de campo aberto no 31º dia de experimento. ANOVA de uma via indicou efeitos significativos de tratamento sobre no número de entradas nos braços abertos [ $F(2, 18) = 31,75, p < 0,001$ ] sobre os animais pertencentes ao grupo PD-55+VEI e PD-55+MET (figura 12). ANOVA de uma via também indicou efeitos significativos de tratamento [ $F(2, 18) = 8,249, p < 0,05$ ] em relação ao tempo despendido nos braços abertos sobre os animais dos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET (figura 13A) e também efeitos significativos de tratamento sobre o tempo despendido nos braços fechados sobre os grupos PD-55+VEI e PD-55+MET [ $F(2, 19) = 15,88, p < 0,001$ ] (figura 6H). O post-hoc de Bonferroni indicou que os animais do grupo PD-55+VEI e PD-55+MET apresentaram um comportamento tipo ansioso uma vez que o número de entradas nos braços abertos do labirinto (figura 12A) foi significativamente menor em relação aos animais do grupo controle (NGL-VEI) ( $p < 0,05$ ) e os animais do grupo PD-55+VEI despenderam menos tempo nos braços abertos quando comparados ao grupo controle (figura 13A). Além disso, o post-hoc de Bonferroni também indicou que os animais dos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET, tiveram um tempo significativamente maior nos braços fechados quando comparados ao grupo controle (figura 13B).

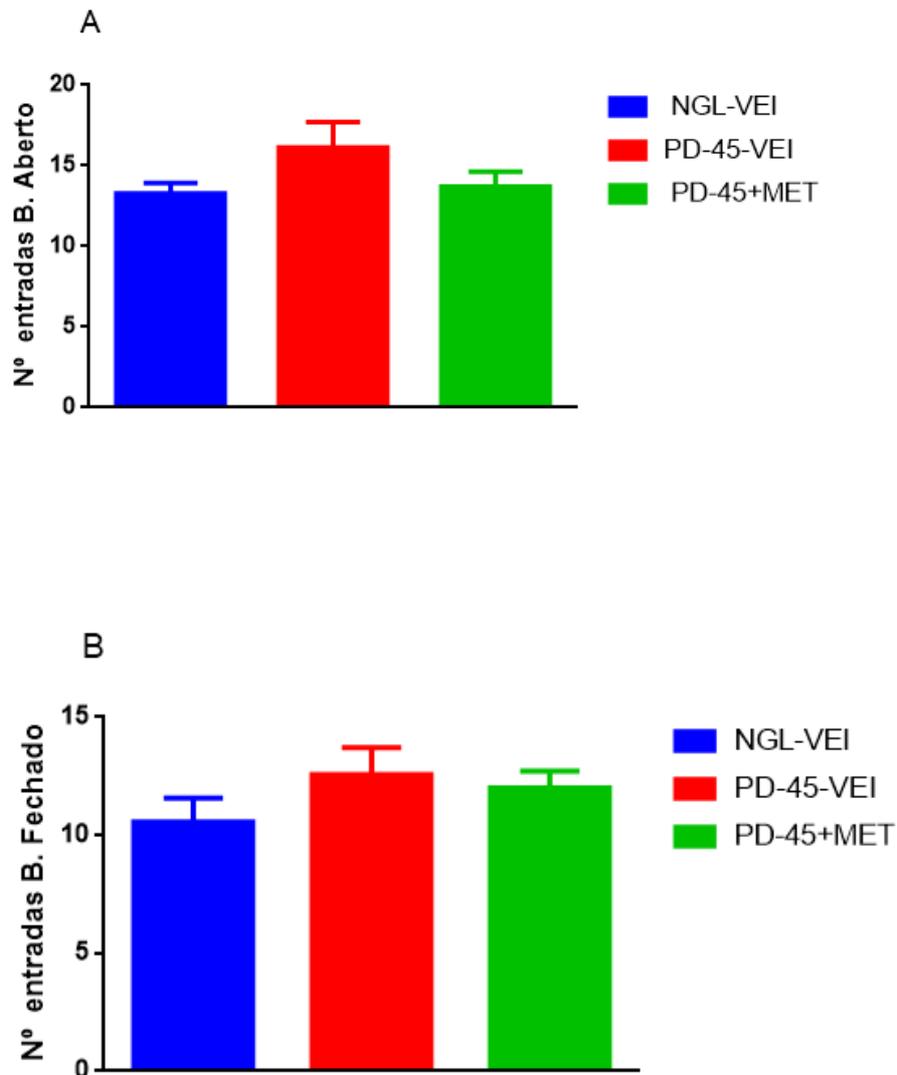


Figura 10: Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida sobre o comportamento tipo-ansioso dos animais pertencentes aos grupos PD-45+VEI e PD-45+MET através da avaliação do número de entradas nos braços abertos (A) e nos braços fechados (B) avaliados pelo teste de labirinto em cruz elevado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo NGL + VEI

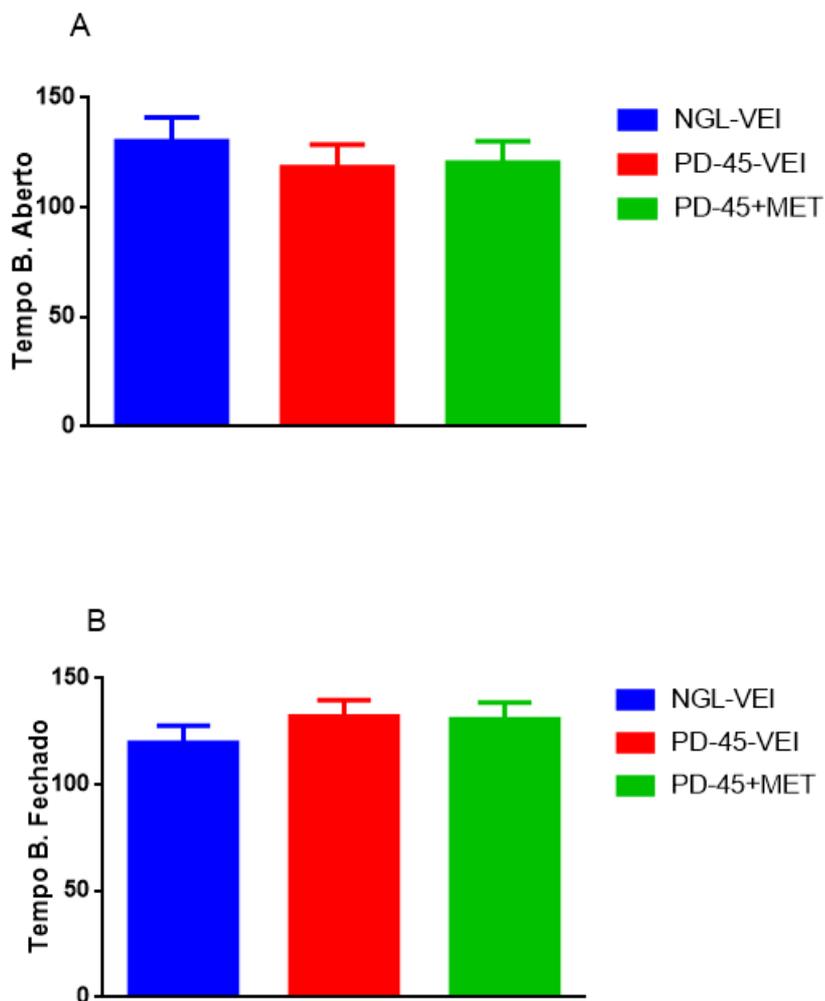


Figura 11: Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida no sobre o comportamento tipo-ansioso dos animais pertencentes aos grupos PD-45+VEI e PD-45+MET através da avaliação do tempo nos braços abertos (A) e nos braços fechados (B) avaliados pelo teste de labirinto em cruz elevado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo NGL + VEI

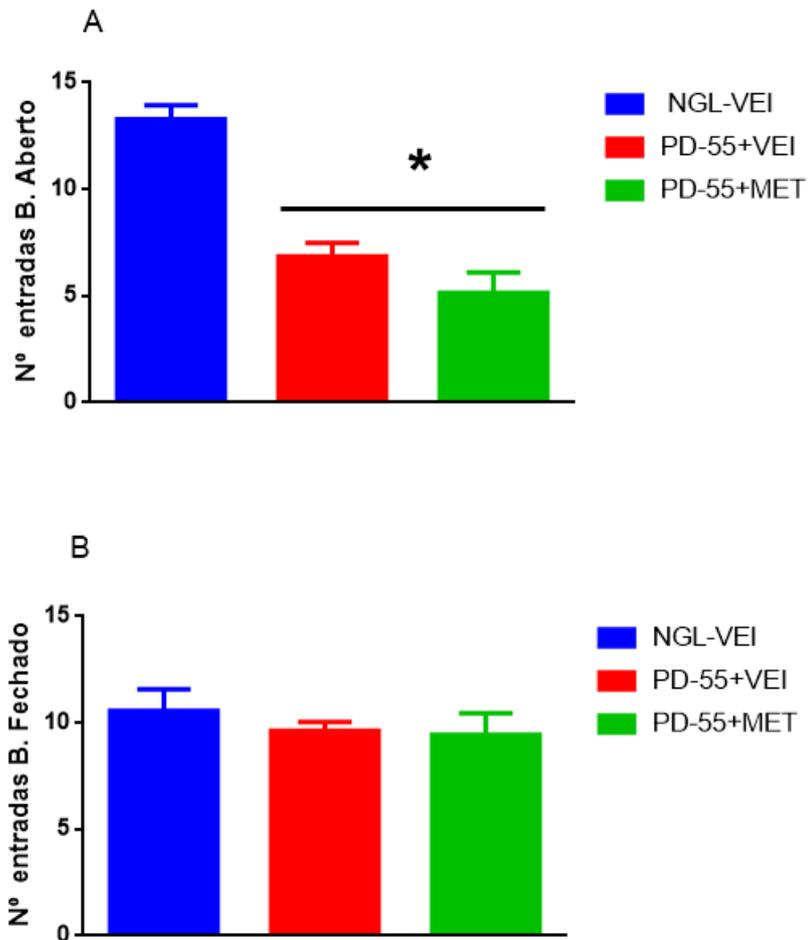


Figura 12: Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida no sobre o comportamento tipo-ansioso dos animais pertencentes aos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET através da avaliação do número de entradas nos braços abertos (A) e nos braços fechados (B) avaliados pelo teste de labirinto em cruz elevado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo NGL + VEI

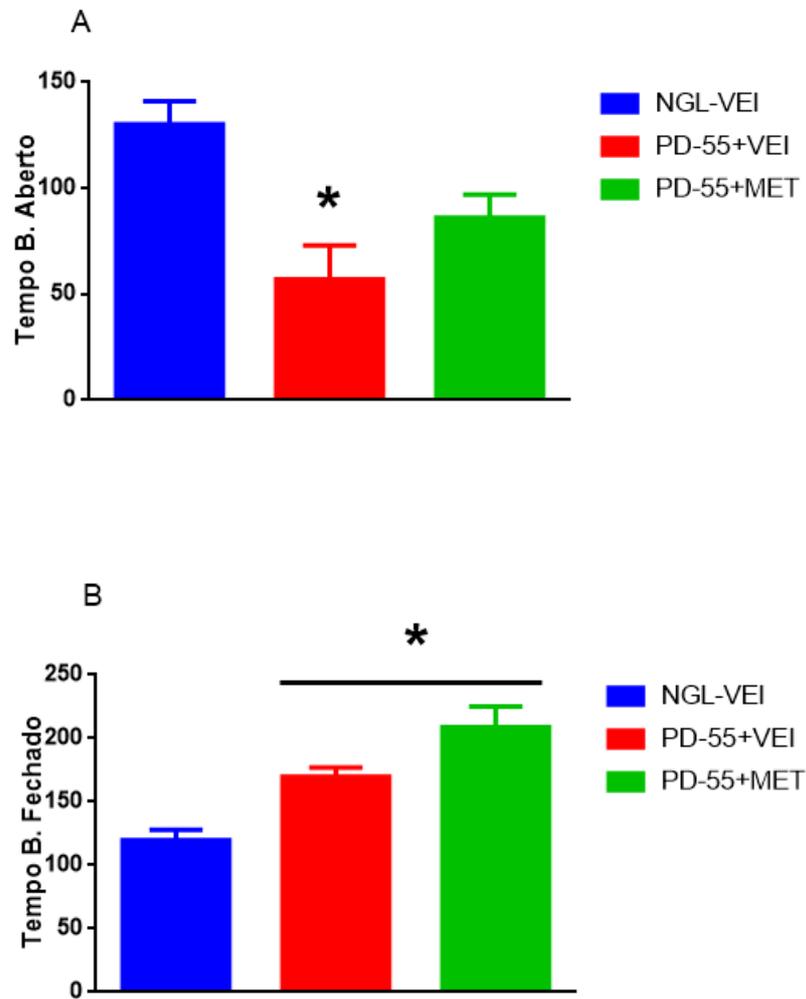


Figura 13: Efeito da combinação estreptozotocina-nicotinamida no sobre o comportamento tipo-ansioso dos animais pertencentes aos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET através da avaliação do tempo nos braços abertos (A) e nos braços fechados (B) avaliados pelo teste de labirinto em cruz elevado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM para 7 a 10 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo NGL + VEI

## 5. DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi o efeito na diminuição do limiar mecânico e no comportamento tipo-ansioso dos animais tratados com a dose STZ-55mg/kg; NA-100mg/kg mesmo apresentando um ligeiro aumento na glicemia. Nesse estudo, as doses de STZ-NA utilizadas não foram capazes de levar a um estado hiperglicêmico, em que os animais pudessem ser caracterizados como diabéticos. Houve um ligeiro aumento na glicemia, sendo que os animais tratados com a dose STZ-55mg/kg; NA-100mg/kg obtiveram um maior aumento na glicemia do que os animais tratados com a dose STZ-45mg/kg; NA-110mg/kg. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a nicotinamida por ter sido aplicada em maior dose tenha protegido demasiadamente os animais dos efeitos nocivos da STZ evitando a hiperglicemia através da inibição da poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) e provisão de NAD<sup>+</sup>. Djordjevic e colaboradores (2018), também se depararam com resultados semelhantes e sugeriram que esse poderia ser um estado de pré-diabetes. O tratamento com metformina (25mg/kg) não foi capaz de alterar a glicemia dos animais tratados. Os animais eram tratados com a metformina uma vez por dia e a glicemia foi sempre medida pela manhã, então pode ser que a metformina não tenha alterado a glicemia pontual dos animais. Seria interessante realizar um teste de hemoglobina glicada capaz de avaliar o controle glicêmico desses animais. Além disso, os animais quando testados em relação a resposta a glicose não apresentaram tolerância a glicose em nenhuma das doses de STZ-NA testadas. Quando se trata de diabetes tipo 2 a resistência à insulina está bastante presente (DEFRONZO, 2004). Ido e colaboradores (1997), demonstraram que o peptídeo C, um produto de clivagem de pró-insulina em insulina impediu ou atenuou a disfunção vascular e neural em ratos diabéticos, sugeriram então um link entre neuropatia diabética e hipoinsulinemia. Além do teste de hemoglobina glicada, também seria bastante interessante a realização de um teste de tolerância insulínica para avaliar se a falta de insulina poderia estar influenciando os resultados. Esses testes não foram realizados devido limitações financeiras. As doses de STZ-NA utilizadas também não foram capazes de alterar significativamente o peso dos animais, esse fato talvez possa ser explicado pelo curto tempo do experimento. Talvez se o tempo do

experimento fosse prolongado, esses animais poderiam chegar a um excesso de peso que combinado com o tratamento STZ-NA poderia levar a níveis mais elevados de glicemia. O excesso de tecido adiposo libera excesso de ácidos graxos que provocam fatores de risco metabólico que predispõem ao diabetes (GRUDY, 2012).

As complicações do diabetes, podem se desenvolver com o aumento da glicemia, mesmo na faixa pré-diabética, exemplo descrito por Ziegler e colaboradores (2008), os quais descreveram o desenvolvimento de polineuropatia no estado pré-diabético. Assim, no presente estudo, os animais pertencentes ao grupo PD-45+VEI apresentaram uma significativa diminuição no limiar mecânico no 7º dia após a injeção de STZ-NA, mas a partir desse dia manteve seu limiar semelhante aos animais do grupo controle. Essa diminuição no 7º dia pode ter ocorrido por algum interferente no dia do teste, por exemplo, estresse por parte dos animais testados.

Os grupos PD-55+VEI e PD-55+MET apresentaram diminuição do limiar mecânico a partir do 14º dia de experimento e mantiveram o limiar menor em relação ao grupo controle até o 28º dia. Um estudo realizado por Ziegler e colaboradores (2014), demonstrou que entre os indivíduos pré-diabéticos estudados, 25% apresentaram neuropatia periférica. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que os animais pertencentes aos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET receberam uma maior dose de STZ e menor dose NA, ocasionando uma menor proteção da nicotinamida e com isso apresentaram glicemia mais elevada. Esses animais não tiveram um aumento tão elevado na glicemia para serem caracterizados como diabéticos, mas já se sabe que uma das causas da neuropatia periférica se deve pelo aumento da glicose sanguínea e pacientes com glicemia controlada também podem apresentar dor neuropática e outras complicações (ZIEGLER, et al., 2014). Além disso, não só a hiperglicemia, mas também a falta de insulina que age também como hormônio neuroprotetor pode estar envolvida na fisiopatologia das complicações e como mencionado anteriormente seria muito importante medir os níveis de insulina. Os animais tratados com metformina, não apresentaram diferença significativa quando comparados com os animais pré-diabéticos tratados com veículo, seria interessante testar outras doses de tratamento com metformina, testar o sal de

metformina quanto a pureza e até mesmo uma mudança de protocolo, uma vez que os animais se alimentam mais durante a noite e eram tratados pela manhã.

Em relação a avaliação de comportamento tipo-depressivo, não houve diferença significativa nos grupos PD-45+VEI e PD-45+MET quando comparados ao grupo controle. Porém, houve uma alteração inesperada no tempo de imobilidade dos animais pertencentes ao grupo PD-55+VEI, ou seja, eles apresentaram uma redução do tempo de imobilidade e aumento da primeira latência de imobilidade. Esse resultado inesperado pode ser um falso negativo e ter ocorrido por acaso ou ainda possa ser devido ao fato do n desse grupo ser menor ( $n = 6$ ) enquanto que o grupo controle apresentava um  $n = 10$ . Cabe mencionar que estes resultados não corroboram resultados de estudos anteriores obtidos após a indução de um outro modelo de diabetes, o diabetes tipo 1 (REDIVO, et al., 2016; SHIVAVED, et al., 2017). O esperado era que o tempo de imobilidade aumentasse quando comparados ao grupo controle, caracterizando um efeito do tipo depressivo. Tendo em vista que as características comportamentais relacionadas com a depressão ocorrem após vários danos no encéfalo, como aumento de estresse oxidativo, neuroinflamação e desregulação de monoaminas, a ausência de um comportamento do tipo depressivo no presente estudo poderia ser decorrente do curto tempo para que essas alterações ocorressem. Esses resultados obtidos não estão relacionados com alterações locomotoras, uma vez que no teste do campo aberto não houve diferença entre os grupos.

Na avaliação do comportamento tipo-ansioso dos animais, os grupos PD-45+VEI e PD-45+MET não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle. Interessante que os animais pertencentes aos grupos PD-55+VEI e PD-55+MET apresentaram comportamento tipo ansioso, sendo que estes obtiveram menor número de entradas nos braços abertos do labirinto. Diferentemente do que observamos em relação ao comportamento depressivo, que parecem ocorrer mais tardiamente, esses dados sugerem que as alterações comportamentais associadas a ansiedade poderiam ocorrer em um menor espaço de tempo. Quando testados em relação ao número de entradas nos braços abertos do labirinto é possível perceber que a metformina não alterou o resultado dos grupos, mas quando avaliado o tempo despendido

nos braços abertos, o grupo pré-diabético tratado com veículo apresentou tempo significativamente menor do que os pré-diabéticos tratados com metformina. Assim, mais uma vez seria muito importante revisar o protocolo de tratamento com a metformina. Novamente os grupos tratados com a maior dose de STZ (55mg/kg) e menor de NA (100mg/kg) e que apresentaram glicemia mais elevada também apresentaram um comportamento tipo-ansioso, sugerindo que o ligeiro aumento na glicemia adicionados a outros fatores que não puderam ser avaliados como níveis de insulina, podem estar intimamente relacionados aos resultados obtidos.

## 6. CONCLUSÃO

A dose de STZ-55; NA-100 relevou ter maiores efeitos sobre a glicemia, alodinia mecânica e comportamento tipo-ansioso dos animais do que a dose STZ-45; NA110. A partir dos testes realizados no presente estudo não é possível afirmar que o ligeiro aumento na glicemia tenha sido responsável pela diminuição do limiar mecânico e tenha causado um comportamento tipo ansioso desses animais, porque apesar do ligeiro aumento na glicemia, os animais não apresentaram resposta diminuída a glicose quando realizado o teste de tolerância a glicose. Esse estudo apresentou algumas limitações financeiras para realização de outros testes que seriam essenciais para maior elucidação dos resultados e para validação do modelo.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALAM, U.; ASGHAR, O.; AZMI, S.; MALIK, R. General aspects of diabetes mellitus. **Handbook of Clinical Neurology**, V. 126, n 15, 2014.
- BAIR, M. J.; BRIZENDINE, E. J.; ACKERMANN, R. T.; SHEN, C.; KROENKE, K.; MARRERO, D. G. Prevalence of pain association with quality of life, depression and glycaemic control in patients with diabetes. **Diabetic Medicine**, v.27, p.578-584, 2010.

BRUCE, D. G.; DAVIS, W. A.; DRAGOVIC, M.; DAVIS, T. M. E.; STARKSTEIN, S. E. Comorbid anxiety and depression and their impact on cardiovascular disease in type 2 diabetes: The Fremantle Diabetes Study Phase II. **Depression and Anxiety**, v.33, p.960-966, 2016.

CALCUTT, N. A. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. **International Review of Neurobiology**, V. 50, 2002.

ÇAKICI, N.; FAKKEL, T. M.; NECK, J. W. V.; VERHAGEN, J. H. Systematic review or meta-analysis systematic review of treatments for diabetic peripheral neuropathy. **Diabetic Medicin**, V. 33, n 11, p. 1466-1476, 2016.

CHAO, P. C.; YINGXIAO, L.; CHANG, C.; SHIE, J. P.; CHENG, J.; CHENG, K. Investigation of insulin resistance in the popularly used four rat models of type-2 diabetes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, p. 155–161, 2017. 155–161, 2018.

CHEN, L.; MAGLIANO, D. J.; ZIMMET, P. Z. The world wide epidemiology of type 2 diabetes mellitus: present and future perspectives. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 4, p. 228–236, 2011.

CROFFORD, L. J. Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 126, p. 167–83, 2015.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **Leading General Medical Journal**, v.348, 2014.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The Medical clinics of North America**, v. 88, p. 787–835, 2004.

DEUIS, J.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v.10, p-284, 2017.

DJORDJEVIC, B. et al. Oral supplementation with melatonin reduces oxidative damage and concentrations of inducible nitric oxide synthase , VEGF and matrix metalloproteinase 9 in the retina of rats with streptozotocin / nicotinamide induced pre-diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, n. June, p. 290–297, 2018.

DZIEMIDOK, P.; DĄBROWSKI, M.; MAKARA-STUDZIŃSKA, M. Relationship between diabetic neuropathy and occurrence of depression among diabetic patients. **Psychiatria Polska**, v. 2674, n. 19, 2015.

ELBINOUNE, I.; AMINE, B.; SHYEN, S.; GUEDDARI, S.; ABOUQAL, R.; HAJJAJ-HASSOUNI, N. Chronic neck pain and anxiety-depression: prevalence and associated risk factors. **Pan African Medical Journal**, v.24, p.89, 2016.

FEINGOLD, D.; BRILL, S.; GOOR-ARYEHD, I.; DELAYAHUE, Y.; LEV-RANB, S. Depression and anxiety among chronic pain patients receiving prescription

opioids and medical marijuana. **Journal and Affective Disorders**, v.218, p.1-7, 2017.

FELDMAN, E. L.; BENNETT, D. L. H.; NAVE, K.; JENSEN, T. S. New horizons in diabetic neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and pain. **HHS Public Access**. v. 93, n. 6, p. 734–763, 2018.

GOULD, T. D; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The open field teste. Modd and Anxiety Related Phenotypes in Mice. **Neuromethods**, v.42, p. 1-20, 2009.

GRUNDY, S. M. Pre-Diabetes , Metabolic Syndrome , and Cardiovascular Risk. **JAC**, v. 59, n. 7, p. 635–643, 2012.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.327, p.1-5, 1984.

Huizinga, M. M.; Peltier, A. Painful diabetic neuropathy: a management-centered review. **Clin Diabetes**, v.25, p.6–15, 2007

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Disponível em: <http://www.idf.org/about-diabetes> . Acesso em: 01/12/2019.

JAIN, R.; JAIN, S.; RAISON, C. L.; MALETIC, V. Painful diabetic neuropathy is more tha pain alone: Examining the role of axiety and depression as mediators and complicators. **Current Diabetes Reports**, v.11, p.275-284, 2011.

JAVED, S.; PETROPOULOS, I. N.; ALAM, U.; MALIK, R. A. Treatment of painful diabetic neuropathy. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 6, n. 1, p. 15–28, 2015.

KOLB, H.; MARTIN, S. Environmental / lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. **BMC Medicin**, p. 1–11, 2017.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The Journal of Pain's**, v. 10, p. 895-926, 2009.

LECHLEITNER, M.; ABRAHAMIAN, H.; FRANCESCONI, C.; KOFLER, M. Diabetic neuropathy. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 128, n. S2, p. 73–79, 2016.

MASIELLO, P.; BROCA, C.; GROSS, R.; ROYE, M.; MANTEGHTTI, M.; HILLAIRE-BUYS, D.; NOVELLI, M.; RIBES, G. Experimental NIDDM Development of a New Model in Adult Rats Administered Streptozotocin and Nicotinamide. **Diabetes**, v. 47, 1998.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Research Review**, v. 52, p. 240-264, 2006.

MONDELLI, M.; ARETINI, A.; BALDASSERONI, A. Distal Symmetric Polyneuropathy in Diabetes. Differences between Patients with and without Neuropathic Pain. **Experimental and Endocrinology & Diabetes**, v.120, p. 45-50, 2012.

MORRIS, J. K.; ZHANG, H.; GUPTA, A. A.; BOMHOFF, G. L.; STANFORD, J. A.; GEIGER, P. G. Measures of striatal insulin resistance in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1240, p. 185–195, 2008.

MUIR III, William, W.; GAYNOR, J. S. Manual de controle da dor em Medicina Veterinária. 2ed. São Paulo: **MedVet**, 643p, 2009

MUNIYAPPA, R.; LEE, S.; CHEN, H.; QUON, M. J. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 294, n. 1, p. E15–E26, 2008.

NAICKER, K.; OVERLAND, S.; JOHNSON, J. A.; MANUEL, D.; SKOGEN, J. C.; SIVERTSEN, B.; COLMAN, I. Symptoms of anxiety and depression in type 2 diabetes: Associations with clinical diabetes measures and self-management outcomes in the Norwegian HUNT study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 84, n. March, p. 116–123, 2017.

NAICKER, K.; OVERLAND, S.; JOHNSON, J. A.; MANUEL, D.; SKOGEN, J. C.; SIVERTSEN, B.; COLMAN, I. Type 2 Diabetes and Comorbid Symptoms of Depression and Anxiety: Longitudinal Associations With Mortality Risk. **Diabetes Care**, v. 40, n. March 2017, p. 352–358, 2018.

NASCIMENTO, O. J. M.; PUPE, C. C. B.; CAVALCANTI, E. B. U. Diabetic neuropathy. **Revista Dor**, V. 17, p. 46-51, 2016.

PETRAK, F.; ROHRIG, B.; ISMAIL, K. Depression and diabetes. **EndoText**, 2018

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapie**, v.229, p.327-336, 1997.

REDIVO, D. D. B. et al. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. **Behavioural Brain Research**, v. 298, p. 57–64, 2016.

RUSSELL, J. W.; ZILLIOX, L. A. Diabetic neuropathies. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, v. 20, n. 5, p. 1226–1240, 2014.

SHIVAVEDI, N. et al. Metformin and ascorbic acid combination therapy ameliorates type 2 diabetes mellitus and comorbid depression in rats. **Brain Research**, v. 1674, p. 1–9, 2017.

SILVA, M.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivo brasileiro de endocrinologia e Metabologia**, v.55, 2011.

SINGH, R.; KISHORE, L.; KAUR, N. Diabetic peripheral neuropathy: Current perspective and future directions. **Pharmacological Research**, v. 80, p. 21–35, 2014.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; HAEFTEN, T. W. VAN. Type 2 diabetes : principles of pathogenesis and therapy. v. 365, 2010.

SZKDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, v.50, p.537-546, 2001.

SZKUDELSKI, T. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat: Characteristics of the experimental model. **Experimental Biology and Medicine**, p.481-490. 2012.

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, 2013.

YALCIN, I.; BARTHAS, F.; BARROT, M. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Emotional consequences of neuropathic pain : Insight from preclinical studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 154–164, 2014.

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

Y. IDO, et al. Prevention of Vascular and Neural Dysfunction in Diabetic Rats by C-Peptide. **Science**, v.277, p. 563-566, 1997.

WU, Y.; DING, Y.; TANAKA, Y.; ZHANG, W. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. **International Journal of Medical Sciences**, V. 11, p. 1185-1200, 2014.

ZANOVELI, J. M.; DIAS, I. C. S.; SCHREIBER, A. K.; SOUZA, C. P.; CUNHA, J. M. Depression Associated with Diabetes : From Pathophysiology to Treatment . 2016.