

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

FERNANDO RENÉ BENDAÑA CÓRDOBA

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE MIGALINA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSOMEDIAL NA DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA E
ANSIEDADE EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

ALFENAS/MG

2021

FERNANDO RENÉ BENDAÑA CÓRDOBA

EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE MIGALINA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSOMEDIAL NA DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA E ANSIEDADE
EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva

ALFENAS/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema de
Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas Biblioteca Central –
Campus Sede

Bendaña Córdoba, Fernando René

B458e Efeito da microinjeção de migalina na substância cinzenta periaquedutal dorsomedial na dor neuropática crônica e ansiedade em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. / Fernando René Bendaña Córdoba. – Alfenas, MG, 2021.

56 f.: il. –

Orientador: Marcelo Lourenço da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.

Bibliografia.

1. Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsomedial. 2. Migalina.
3. Neuropatia Diabética. 4. Estreptozotocina. 5. Dor Crônica. I. Silva, Marcelo Lourenço da. II. Título.

CDD- 617

Fernando Rene Bendaña Córdoba

EFEITO DA MIGALINA NA SUBSTÂNCIA PERIAQUEDUTAL DORSAL MEDIAL NA DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA E ANSIEDADE EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovada em: 31 de maio de 2021

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves
Instituição: Universidade Federal de Lavras
UFLA

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso
UFMT



Documento assinado eletronicamente por Marcelo Lourenço da Silva, Professor do Magistério Superior, em 31/05/2021, às 12:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por RICARDO DE OLIVEIRA, Usuário Externo, em 31/05/2021, às 14:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Fernando Henrique Ferrari Alves, Usuário Externo, em 31/05/2021, às 14:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0521332 e o código CRC DD505D88.

Aos meus pais Jorge e Natalia, pelo sustento, a compreensão, ajuda, amor e orientação na minha vida. A minha família inteira por ser tão unida nos momentos mais difíceis e o apoio sempre especial. Com toda minha gratidão por todo o que sempre fizeram e ainda fazem por mim e por crer nos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A deus, por ser luz e fortaleza no meu caminho.

A meu orientador o professor Dr. Marcelo Lourenço da Silva, pela confiança depositada em mim.

A minha família, por tudo o apoio e compressão durante tudo esse processo, vocês são o meu motivo principal do meu sucesso.

Ao professor Dr. Renato de Freitas, pela orientação e por compartilhar seus conhecimentos nas disciplinas e nas conversas privadas.

A minha noiva Andrea Rodríguez, que sempre esteve comigo para me ajudar a crescer como profissional e pessoa.

A secretária do programa Adriana e professor Valdemar, por ter me acolhido e orientado nos processos acadêmicos.

A banca pelos ensinamentos, conhecimentos e apontamentos essenciais.

Aos organismos OEA, GRUPO COIMBRA e CAPES, por ter me concedido a oportunidade de fazer meus estudos superiores no Brasil. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, a todas as pessoas envolvidas no meu crescimento profissional e pessoal e pelo carinho obtido por parte de todos.

RESUMO

O *diabetes mellitus* (DM) é das principais doenças que afetam o mundo inteiro e aproximadamente mais de 463 milhões de pessoas sofrem desta doença. O DM apresenta alterações no pâncreas que causam deficiência na produção de insulina, e isso gera dois tipos de DM, tipo 1 ou insulina-dependente e tipo 2 ou insulina-não dependente. Assim, o DM tipo 1 pode desenvolver complicações como os danos aos nervos e alterações micro e macrovasculares conhecidas como neuropatia diabética (ND). A ND pode desenvolver comorbidades como ansiedade, depressão ou distúrbio do sono. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da microinjeção da poliamina sintética Migalina na substância cinzenta periaquedutal dorsomedial (SCPdm) sobre a dor neuropática crônica e ansiedade em ratos Wistar com DM induzida por estreptozotocina (STZ). Foi induzida a DM tipo 1 nos ratos com STZ intraperitoneal, com dose única de 60 mg/kg, após isso, foram monitorados o peso e a glicemia dos animais, além de seu desenvolvimento de ND, aplicando os testes de alodinia mecânica com *von frey* e ao frio com o teste de acetona. Aos 28 dias de indução de DM foi realizada microinjeção de migalina (0,002 µg/µL, 0,02 µg/µL e 0,2 µg/µL) na SCPdm. Foram avaliados os testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste de campo aberto (*open field*). De tal modo, os animais tratados com STZ apresentaram aumento da glicemia a partir das 48h após indução e foi mantida durante o tempo de estudo. A perda de peso foi observada no dia 7 e continuou até o dia 28. Os animais tratados com STZ apresentaram respostas aversivas maiores do que o grupo controle com o teste inócuo de *von Frey*, e quando tratados com migalina (0,002 µg/µL, 0,02 µg/µL e 0,2 µg/µL) a resposta diminuiu nos tempos 15, 30 e 45 minutos, sendo que a dose mais alta 0,2 µg/µL foi prolongada até 90 minutos. No teste de acetona os grupos neuropáticos apresentaram respostas alteradas, no entanto, quando os grupos tratados foram administrados com migalina revelou melhora nos tempos 5, 15 e 30 minutos e apenas a dose maior 0,2 µg/µL atingiu aos 45 minutos. O teste de campo aberto e LCE não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e a administração da migalina nas três doses diferentes não teve incidência nos comportamentos. Os resultados sugerem que a migalina aplicada na SCPdm tem potencial analgésico e pode ser útil no tratamento da ND, mas não interfere no comportamento dos animais.

Palavras-chaves: Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsomedial; Migalina; Neuropatia Diabética; Estreptozotocina; Dor Crônica.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is one of the main diseases that affect the entire world and approximately more than 463 million people suffer from this disease. DM presents alterations in the pancreas that cause deficiency in insulin production, generating two types of DM, type 1 or insulin-dependent and type 2 or non-insulin dependent. Thus, type 1 DM can develop complications such as nerve damage and micro/macrovacular alterations known as diabetic neuropathy (DN). DN can develop comorbidities such as anxiety, depression or sleep disturbance. The present study aimed to evaluate the effect of microinjection of the synthetic polyamine Migalin in the dorsomedial periaqueductal gray matter (PAGdm) on chronic neuropathic pain and anxiety in Wistar rats with streptozotocin-induced DM (STZ). Type 1 DM was induced in rats with intraperitoneal STZ, with a single dose of 60 mg/kg, after that, the animals' weight and blood glucose were monitored, in addition to their development of DN, applying mechanical allodynia tests with von frey and cold with the acetone test. At 28 days of DM induction, microinjection of mygalin (0.002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in the PAGdm was performed. Elevated plus maze (EPM) and open field tests were evaluated. Thus, animals treated with STZ showed increased glycemia from 48h after induction and remaining during the study period. Weight loss was observed on day 7 and continued until day 28. Animals treated with STZ showed greater aversive responses than the control group with the von Frey's innocuous test, and when treated with migalin (0, 002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) the response decreased at times 15, 30 and 45 minutes, and the highest dose 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ was prolonged up to 90 minutes. In the acetone test, the neuropathic groups showed altered responses, however, when the treated groups were administered with migaline, it showed improvement at times 5, 15 and 30 minutes and only the highest dose 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ reached 45 minutes. The open field test and EPM did not show significant differences between groups and the administration of mygalin at the three different doses had no impact on behavior. The results suggest that mygalin applied to PAGdm has analgesic potential and may be useful in the treatment of DN, but does not interfere with the animals' behavior.

Keywords: Dorsomedial Periaqueductal Gray Substance; Mygalin; Diabetic Neuropathy; Streptozotocin; Chronic Pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismos da neuropatia diabética	18
Figura 2- Áreas da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP).....	24
Figura 3- Estrutura molecular de STZ	25
Figura 4- Mecanismos de ação diabetogênicos da STZ.....	26
Figura 5- Estrutura da Migalina N1, N8-bis (2,5 dihidroxibenzoil) espermidina	28
Figura 6- Grupos experimentais	31
Figura 7- sítios de microinjeção da droga migalina na SCPdm.....	33
Figura 8- Figura representativa do procedimento experimental empregado no projeto .	33
Figura 9- Figura representativa do procedimento experimental empregado na parte III do projeto	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1- Medidas de Glicose no sangue durante 4 semanas de estudo.....	36
Gráfico N° 2- Medidas de Peso durante 4 semanas de estudo.....	37
Gráfico N° 3- Limiar nociceptivo avaliado pelo teste von Frey.....	39
Gráfico N° 4- Avaliação térmica de dor pelo teste Cold.....	40
Gráfico N° 5- Avaliação de comportamento tipo ansioso por atividade locomotora no teste de campo aberto “open field”	41
Gráfico N° 6- Avaliação de comportamento tipo ansioso por atividade de exploração nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA:	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
Ca:	Cálcio
CCI:	Injúria por Constrição Crônica do nervo Ciático
DM:	Diabetes Mellitus
DM1:	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2:	Diabetes Mellitus Tipo 2
DN:	Dor Neuropático
ER:	Retículo endoplasmático
FFA:	ácidos graxos livres
GABA:	ácido -aminobutírico
GAS:	Escore de ansiedade geral
HAD:	Escala de Ansiedade e Depressão hospitalar
IAS:	Escore de ansiedade de injeção
LB1:	Línea de Base 1
LB2:	Línea de Base 2
LC:	<i>Locus coeruleus</i>
LCE:	Labirinto em cruz elevado
Na:	Sódio
ND:	Neuropatia Diabética
NMDA:	N-metil D-Aspartato
NO:	Oxido Nítrico
NP:	Neuropatia Periférica
PET:	Tomografia por emissão de pósitrons
PI3-K:	quinase fosfatidilinosi-tol-3
PNPASS:	Polineuropatia diabética axonal, simétrica, mista, e de predomínio sensitivo.
QV:	Qualidade de Vida
rCBF:	Fluxo Sanguíneo Cerebral regional
RNS:	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS:	Espécies Reativas de Oxigênio
SCP:	Substância Cinzenta Periaquedutal

SCPdm: Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial
STZ: Estreptozotocina
TAG: Transtorno de Ansiedade generalizada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	DIABETES MELLITUS	13
1.2	NEUROPATIA DIABÉTICA.	14
1.3	COMORBIDADE ENTRE DOR NEUROPÁTICO DIABÉTICO E ANSIEDADE.....	17
1.4	DOR.....	20
1.5	SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (SCP).....	22
1.6	MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROPATIA DIABÉTICA.	23
1.7	MIGALINA	25
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAIS E MÉTODO	29
3.1	ANIMAIS.	29
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	29
3.3	INDUÇÃO DA DIABETES MELLITUS TIPO I.	30
3.4	DETERMINAÇÃO DA GLICOSE	30
3.5	IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA GUIA NA SCP E ADMINISTRAÇÃO DE MIGALINA	31
3.6	DETERMINAÇÃO DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO DA DROGA NA SCPDM	32
3.7	TESTES NOCICEPTIVOS.	32
3.7.1	Teste de alodínia mecânica.....	33
3.7.2	Teste de alodínia ao frio.	33
3.8	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	34
3.8.1	Teste de labirinto em cruz elevado	34
3.8.2	Teste de campo aberto.....	35
3.9.	MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	35
4	RESULTADOS.....	36
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM), segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), é um distúrbio metabólico de múltipla etiologia, caracterizado por hiperglicemia crônica e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Tem elevada prevalência no mundo, e, se não tratada, pode levar a desfechos graves como doença cardiovascular e cerebrovascular, cegueira, dano renal e morte. Deficiência em produção e uso de insulina, hormônio produzido pelo pâncreas, é a causa principal da doença, que pode ocorrer por fatores genéticos e relacionados ao estilo de vida. Classifica-se em diabetes tipo 1 ou insulino dependente e tipo 2 ou não dependente de insulina.

Dados da *International Diabetes Federation* (IDF, 2019) indicam que há cerca de 463 milhões de pessoas adultas entre as idades de 20-79 anos com DM no mundo, e para a região de América Central e do Sul cerca de 31.6 milhões, e no caso do Brasil o número ascende até 16.8 milhões.

As neuropatias diabéticas (ND) são as complicações crônicas mais prevalentes do DM. Esse grupo heterogêneo de condições afeta diferentes partes do sistema nervoso e apresenta diversas manifestações clínicas (SBD, 2019). Dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido” pela *International Association for the Study of Pain* (IASP) (RAJA *et al.*, 2020). A IASP (IASP, 2017) define a neuropatia como “perturbação da função ou alteração patológica em um nervo”. Por outro lado, Samper-Bernal *et al.*, (2010) define Neuropatia Diabética Dolorosa como: “Presença de sintomas e/ou sinais de disfunção nervosa periférica nas pessoas com diabetes, após exclusão de outras causas”.

Adicionalmente, a ND é um fator que impacta negativamente a qualidade de vida dos pacientes levando a desenvolver desequilíbrio nos aspectos emocionais entre os mais comuns a ansiedade, depressão, e distúrbios de sono (BOUHASSIRA *et al.*, 2013; ESPIN-PAREDES *et al.*, 2010; TORRANCE *et al.*, 2013). O principal sintoma que pode afetar a qualidade de vida em pacientes com ND é a dor, no entanto, em uma revisão sistemática mostrou-se uma alta prevalência de ansiedade, depressão e comorbidades do sono entre pacientes com dor ND (Naranjo *et al.*, 2019).

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) desempenha um papel importante na modulação e percepção da dor. Um dos primeiros estudos em humanos da SCP mostrou

que a estimulação elétrica nesta área antes da cirurgia resultou na diminuição da necessidade de anestésicos (ROIZEN, 1985).

Hoje em dia, os esforços em combater as doenças crônicas e, principalmente, as consequências do DM, como a ND, têm dificuldades para encontrar o modelo animal certo, por isso, tem-se de selecionar e caracterizar um modelo animal que tenha a maior aproximação a nível fisiopatológico para poder reproduzir e mimetizar as condições de um paciente doente crônico. Nesse contexto, um dos modelos mais utilizado para indução do DM em ratos é o modelo por indução de estreptozotocina (STZ, 2- (3-(metil-3 nitrosoureido)-D-glucopiranoose), que é sintetizada pela bactéria de *Streptomicetos achromogenes* e é utilizada para estudar a DM insulino-dependente e não insulino-dependente e suas complicações (SZKUDELSKI, 2001).

Poliaminas têm sido amplamente estudadas, uma vez que foi observado que estas moléculas interagem com receptores de L-Glu, particularmente os dos tipos ionotrópicos, atuando como antagonistas e moduladores destes receptores (STRØMGAARD; MELLOR, 2004; XIONG *et al.*, 2014). Neste sentido, a migalina é uma poliamina sintética que tem sido estudada como possível tratamento anticonvulsivante, pois parece que tem efeito bloqueador em receptores ionotrópicos de tipo NMDA conhecidos como L-Glu, tendo sítios de ligação a esta molécula de receptor (GODOY *et al.*, 2013). Neste presente estudo a migalina foi microinjetada, em três diferentes doses, na SCP dorso medial (SCPdm) para avaliar seus possíveis efeitos moduladores na dor em animais com ND induzida por STZ.

1.1 DIABETES MELLITUS

O DM é uma condição relacionada à disponibilidade e eficácia da insulina no corpo. O DM tipo 1 é caracterizado por uma falta total de insulina. O DM tipo 2 envolve a resistência dos tecidos periféricos do corpo aos efeitos da insulina. Ambas as formas não têm o efeito de sinalização da insulina quando o glucagon e outros sinais metabólicos estão presentes em níveis normais ou elevados. Um desequilíbrio no metabolismo de carboidratos e seus efeitos em outras vias metabólicas causam DM (MOINI, 2019).

A patogênese do DM começa no pâncreas, onde existem células *alfa* e *beta*. A insulina é produzida pelas células *beta*. Sua função é fazer com que as células do corpo sejam capazes de utilizar a glicose, uma forma de açúcar, para obter energia. Muitos processos corporais requerem glicose, sendo esta absorvida pelas células adiposas,

hepáticas e musculares e armazenado como glicogênio. Os baixos níveis de glicose no sangue fazem com que as células *alfa* produzam glucagon, um hormônio que tem efeitos opostos aos da insulina. O glucagon provoca a degradação do glicogênio no fígado. Isso eventualmente aumenta a glicose presente na corrente sanguínea. Em indivíduos normais, o glucagon e a insulina são equilibrados, mantendo os níveis de glicose no sangue consistentes. Normalmente, a insulina é produzida regularmente, evitando que a glicose no sangue fique muito alto entre as refeições (MOINI, 2019).

O DM tipo I indica destruição das células *beta* que eventualmente leva ao estágio de deficiência absoluta de insulina. Quando a insulina está ausente, a gliconeogênese é descontrolada e os níveis de glicose no sangue tornam-se elevados. A insulina deve ser injetada no corpo como o único tratamento disponível. (MOINI, 2019).

A destruição das células *beta* é geralmente causada por processo autoimune, que pode ser detectado por auto-anticorpos circulantes como anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD), anti-ilhotas e anti-insulina, e, algumas vezes, está associado a outras doenças autoimunes como a tireoidite de Hashimoto, a doença de Addison e a *miastenia gravis*. Em menor proporção, a causa da destruição das células *beta* é desconhecida (MISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O DM tipo II é usada para designar uma deficiência relativa de insulina. A administração de insulina nesses casos, quando efetuada, não visa evitar cetoacidose, mas alcançar controle do quadro hiperglicêmico. (MISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A resistência à insulina faz com que o corpo reaja como se ele não tivesse insulina, embora ela esteja presente em níveis elevados. Semelhante ao diabetes tipo 1 em muitos aspectos, esta forma difere porque o fígado ainda é capaz de produzir glicogênio e a lipólise é controlada devido à presença de insulina. (MOINI, 2019)

1.2 NEUROPATIA DIABÉTICA

A complicação mais comum do DM é a ND, compreendendo um conjunto de síndromes clínicas que afetam o sistema nervoso periférico sensitivo, motor e autonômico, de forma isolada ou difusa, nos segmentos proximal ou distal, de instalação aguda ou crônica, de caráter reversível ou irreversível, manifestando-se silenciosamente ou com quadros sintomáticos dramáticos. A forma mais comum é a ND simétrica sensitivo motora distal. Pode se manifestar por sensação de queimação, choques, agulhadas, formigamentos, dor a estímulos não-dolorosos, câimbras, fraqueza ou

alteração de percepção da temperatura, com exacerbação à noite e melhora com movimentos. (MINISTERIO DA SAUDE, 2006)

Samper-Bernal *et al.*, (2010) definiram o conceito de ND dolorosa como a presença de sintomas e/ou sinais de disfunção nervosa periférica nas pessoas com diabetes, após exclusão de outras causas. A ND dolorosa afeta aproximadamente 25% dos pacientes diabéticos, que são tratados com insulina e/ou hipoglicemiantes orais.

O estudo de Galer *et al.*, (2000) relata o efeito da dor na qualidade de vida em uma coorte de 105 pacientes com ND dolorosa. A intensidade média da dor deste grupo de pacientes foi moderada, aproximadamente 5,75/10 (em uma escala de 0-10). A dor teve seu maior impacto no 'sono' (pontuação média 5,38), 'prazer de vida' (pontuação média 5,00) e 'atividades recreativas' (pontuação média 4,77), baseada na Pontuação do *Brief Pain Inventory*, uma classificação de 0–10.

As principais lesões anatomopatológicas da ND dolorosa segundo Samper-Bernal *et al.*, (2010) são: uma lesão mista, simétrica e distal, de predomínio sensitivo, lesão uniforme das fibras pequenas (A- δ e C), com o passar do tempo lesionam-se as fibras grossas (A- β) e fibras vegetativas.

Também dentro da patologia da DM está a hiperglicemia persistente que leva ao acúmulo de produtos da via dos polióis (como sorbitol e frutose) nos nervos (GAGLIARDI, 2003; SAMPER-BERNAL *et al.*, 2010) causando lesões através de um mecanismo ainda não muito bem conhecido. A diminuição da incorporação de mioinositol e inibição da bomba Na/K/ATPase resulta em retenção de sódio, edema da bainha de mielina, disjunção axoglial e degeneração nervosa. (GAGLIARDI, 2003).

A ND pode apresentar-se com diferentes síndromes de acordo com sua distribuição e envolvimento neurológico (figura 1). Em alguns estudos, aproximadamente 50% dos pacientes com diabetes tinham polineuropatia distal simétrica, 14% eram sintomáticos e uma pequena porcentagem apresentou dificuldades na marcha. Outras neuropatias incluíram neuropatia mediana (25%), neuropatia autonômica (7%) e outras neuropatias, incluindo poliarradiculopatia torácica, lombar e mononeuropatias cranianas (3%) (ÁLVAREZ *et al.*, 2012).

Entre as síndromes de neuropatia diabética dolorosa temos: Neuropatia hiperglicêmica: em pacientes com diabetes recente, disestesias e dor distal que são resolvidos com o controle da glicemia. (PÉREZ; AYUGA, 2000). Um estudo mostrou uma melhora rápida e significativa do controle glicêmico (neste caso, pela terapia

intensiva com insulina) ao tratamento usual com antineuríticos puros, uma redução mais precoce e significativa da dor em pacientes com ND é obtida. (BASTÍAS *et al.*, 2006).

Polineuropatía diabética: axonal, simétrica, mista, e de predomínio sensitivo (PNPASS): transtorno sensitivo com topografia de luva e meia. Muitas vezes é subclínica durante longo tempo e finalmente se torna evidente quando aparecem os sintomas positivos como parestesias, dormência e dor. (PÉREZ; AYUGA, 2000). É geralmente considerado predominantemente axonal, no entanto, vários graus de desmielinização estão frequentemente presentes pelo menos eletrofisiologicamente (UEHARA *et al.*, [S.d.])

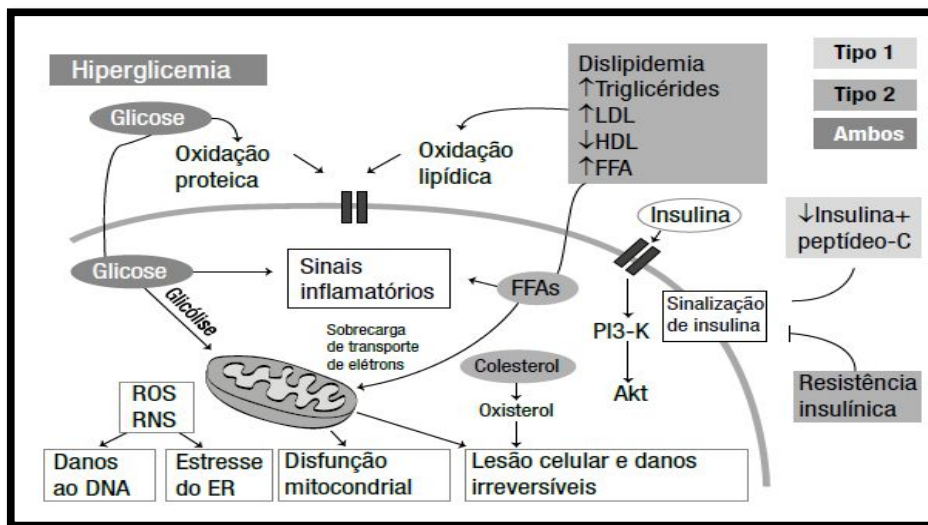
A Polineuropatía motora sensorial é a forma mais comum de neuropatia periférica diabética (BOULTON *et al.*, 1998). Embora as estimativas variem, parece que pelo menos uma manifestação de Polineuropatía está presente em pelo menos 20% dos pacientes diabéticos adultos (BOULTON, 2005).

Neuropatia de fibras de pequeno diâmetro: é a representação mais genuína da Polineuropatía diabética dolorosa. Geralmente aparece na evolução de alguns pacientes com PNPASS. Com frequência, os pacientes referem frieza nos pés sem que eles estejam frios, o que corresponde a hiperatividade anormal dos aferentes de este tipo de sensação. (PÉREZ; AYUGA, 2000).

ND autônoma: pode aparecer com maior frequência em diabéticos tipo 1, juntamente com PNPASS de caráter subclínica ou não. Os sintomas podem ser irritantes, como a hipotensão ortostática, diarreia, gastroparesia ou hipotonia da bexiga. Também pode resultar em morbidade significativa e pode levar à mortalidade em alguns pacientes com diabetes (BOULTON, 2005).

Também há polirradiculopatias diabéticas e Mononeuropatias diabéticas (PÉREZ; AGUYA, 2000). Mononeuropatias são causadas por vasculite e subsequente isquemia e infarto do nervo. Há regeneração espontânea usualmente num período de seis a oito semanas. Os acometimentos mais frequentes são os nervos ulnar, mediano, radial, femoral e cutâneo lateral da coxa. Comumente, mononeuropatias envolvem os pares cranianos 3, 4, 6 e 7 e os nervos periféricos peroneiro, sural, ciático, femoral, ulnar e mediano. O início é agudo e doloroso, e a resolução espontânea ocorre no mesmo período de tempo. (GAGLIARDI, 2003).

Figura 1 - Mecanismos da neuropatia diabética



Fonte: SBD (2019)

Legenda: Fatores ligados ao DM1 (cinza claro), DM2 (cinza) e em ambos os tipos (cinza escuro) causam danos ao DNA, estresse do retículo endoplasmático, disfunção mitocondrial, lesão celular e danos irreversíveis. A importância relativa dos mecanismos nessa rede varia de acordo com o tipo de célula, o perfil da doença e o tempo. ER, retículo endoplasmático; FFA, ácidos graxos livres; PI3-K, quinase fosfatidilinosi-tol-3; RNS, espécies reativas de nitrogênio; ROS, espécies reativas de oxigênio.

1.3 COMORBIDADE ENTRE DOR NEUROPÁTICO DIABÉTICO E ANSIEDADE.

Existem muitos estudos que associam a DM com ansiedade, em estudos de meta-análises onde examinaram a associação entre ansiedade e diabetes em adultos de 16 anos o mais, demonstraram que a DM é um fator de risco para sintomas de ansiedade (SMITH *et al.*, 2013; AMIRI; BENNEZHAD, 2019) e vice-versa, a ansiedade é um fator de risco para desenvolver DM (ENGUM, 2007; SMITH *et al.*, 2018). Numa revisão sistemática de estudos que determinaram a prevalência de ansiedade em DM a partir de escores de limiar em medidas de autorrelato ou entrevistas de diagnóstico, apresentando que o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) estava presente em 14% dos pacientes com DM, a apresentação subsindrômica de transtorno de ansiedade sem outra especificação e de sintomas de ansiedade elevados foram encontrados em 27% e 40%, respectivamente dos pacientes com DM, a prevalência de sintomas elevados foi semelhante em pacientes com DM tipo 1 vs. tipo 2 (41,3% vs. 42,2%, $P = 0,80$) (GRIGSBY *et al.*, 2002).

Um estudo de 2006, nos Estados Unidos, mostrou que pessoas com DM tinham uma prevalência 20% maior de diagnóstico de ansiedade ao longo da vida do que aqueles que não tinham DM. O DM foi significativamente associado à ansiedade, especialmente

em hispânicos e adultos jovens. (LI *et al.*, 2008) e em outro estudo mostrou-se que os pacientes com transtornos de ansiedade revelaram uma maior incidência de DM em todas as faixas etárias, tanto em mulheres quanto em homens. (CHIEN; LIN, 2016).

Estudos transversais de pessoas com DM dos tipos 1 e 2, com base na avaliação do nível de ansiedade e depressão (HAD), mostrou evidência de sintomas de ansiedade e depressão em pacientes com DM, (KHUWAJA *et al.*, 2010) além disso o sexo feminino e baixo controle glicêmico foram fatores de risco associados apenas a maiores escores de ansiedade. (COLLINS *et al.*, 2009). Alguns fatores sociológicos como idade, sexo, trabalho e escolaridade também estão relacionados a esses transtornos psicológicos em pacientes diabéticos (PALIZGIR *et al.*, 2013).

O monitoramento de parâmetros bioquímicos como HbA1c e níveis de glicose no sangue pós-prandial e Índice de Massa Corporal pode ser um guia para o desenvolvimento de ansiedade em pacientes com DM. Além disso, o exercício físico parece ter um efeito protetor sobre a ansiedade em pessoas com DM tipo 2 (BALHARA; SAGAR, 2011). Em outro estudo com Pacientes consecutivos não selecionados, tratados com insulina preencheram um questionário com um escore de ansiedade de injeção (IAS) e um escore de ansiedade geral (GAS) apresentando que os sintomas relacionados à ansiedade e fobia à injeção de insulina têm uma alta prevalência em um grupo de pacientes diabéticos que requerem injeções de insulina e estão associados a níveis mais elevados de ansiedade geral. (ZAMBANINI *et al.*, 1999).

O DM possui outros aspectos patológicos além dos transtornos emocionais, sendo a Neuropatia Diabética (ND) um componente muito comum desenvolvido a partir desta. ND é um fator que impacta negativamente a qualidade de vida dos pacientes levando a desenvolver desequilíbrio nos aspectos emocionais entre os mais comuns a ansiedade, depressão, e distúrbios de sono (BOUHASSIRA *et al.*, 2013; ESPIN-PAREDES *et al.*, 2010; TORRANCE *et al.*, 2013) constituindo o aparecimento ou agravamento destas condições, pois pode ser um agregado aos transtornos psicológicos preexistentes.

O principal sintoma que pode afetar a qualidade de vida em pacientes com ND é a dor, portanto, uma revisão sistemática mostrou uma alta prevalência de ansiedade, depressão e comorbidades do sono entre pacientes com dor neuropática diabética (Naranjo *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2010). Geelen e colaboradores em 2017 mostraram que os níveis de intensidade e duração da dor e medo de cair foram associados negativamente com a qualidade de vida em pacientes com Neuropatia Diabética

Dolorosa. A intensidade da dor, o sexo masculino e o medo de cair associaram-se positivamente à incapacidade (GEELEN *et al.*, 2017). Um estudo em pacientes com DM tipo 2, mostrou que os indivíduos que tinha maior intensidade da dor foram também aqueles que apresentaram maior grau de ansiedade e eram casos possíveis de depressão. (NERI, 2015).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) em 2020, o DM é a causa mais comum da neuropatia periférica e este tipo de neuropatia apresenta quadros de dor crônico. Um estudo sistemático usando o banco de dados PubMed para pesquisar artigos sobre Qualidade de Vida (QV) em Neuropatia Periférica dolorosa, mostrou que a QV é prejudicada na NP dolorosa (GIRACH *et al.*, 2019). Outro estudo de corte transversal demonstrou uma elevada frequência de sintomas ansiosos (sendo esta com mais prevalência) e depressivos em pacientes com neuropatia periférica, havendo uma correlação positiva com a gravidade da dor. (BRASIL; PONDE, 2009).

Os sintomas depressivos/ansiedade e dor, em conjunto, apresentaram piores desfechos clínicos de cada estado sozinho (CASTRO *et al.*, 2011). Em pacientes com dor crônica, existe prevalência de sintomas ansiosos e depressivos, e a ansiedade mostrou-se em um nível mais alto do que a depressão (PINHEIRO *et al.*, 2014), pacientes com dor intensa/extrema apresentaram maior frequência de ansiedade do que aqueles com dor selvagem/moderada. No entanto, a frequência de depressão não atingiu significância estatística quando ambos os grupos foram comparados. (CASTRO *et al.*, 2011). Em um estudo transversal por médio da escala HAD e Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional Versão Brasileira 5.0.0 (M.I.N.I. PLUS) também foi corroborado que pacientes com dor apresentaram ansiedade e depressão, sendo a ansiedade a que tem maior prevalência (CASTRO *et al.*, 2006).

Em contraste, existem poucos estudos em animais que demonstrem a relação entre dor neuropático diabético e comorbidades tipo ansioso e depressivo. Um estudo com camundongos neuropáticos machos e fêmeas foram submetidos a condições de vida de controle ou estresse contínuo, a longo prazo, ambos os sexos exibiram um comportamento pronunciado de ansiedade, independentemente da exposição ao estresse. Esses comportamentos contínuos de ansiedade foram corroborados com os níveis de corticosterona plasmática em grupos distintos de animais. Esses dados demonstram uma forte ligação entre dor neuropática crônica e ansiedade crônica, sendo o impulsionador

dessa comorbidade é a dor neuropática em oposição ao estresse contínuo. (SIEBERG *et al.*, 2018).

Num estudo comparativo entre ratos diabéticos induzidos por STZ e um modelo de neuropatia por lesão de constrição crônica (CCI) do nervo ciático, observou-se que a hipersensibilidade nociceptiva diabética apareceu gradativamente, atingindo seu máximo na quarta semana. Em contraste, o CCI apresentou uma diminuição acentuada em seu limiar sensorial no sétimo dia. Em ambos os modelos, o fenótipo semelhante à ansiedade era evidente após quatro semanas, mas não antes, coincidindo com as alterações do *locus coeruleus* (LC). Este estudo demonstrou que o comportamento do tipo ansiedade induzida pelo DM com prejuízo do LC em longo prazo. No entanto, o curso de tempo da sensibilidade nociceptiva, assim como as funções LC, mostraram características distintas em comparação com o modelo CCI, indicando que mecanismos neuroplásticos específicos estão em ação em todos os modelos. (ALBA- DELGADO *et al.*, 2016).

1.4 DOR

A dor é uma sinalização diante de uma situação ou perigo iminente, sendo uma resposta adaptativa. É definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido” pela International Association for the Study of Pain (RAJA *et al.*, 2020). O prolongamento desta dor indica lesão tecidual e leva ao processamento anormal de informação sensorial pelo sistema nervoso (BOYCE-RUSTAY; JARVIS; J. M., 2009), caracterizando assim, a gênese da dor crônica.

A dor crônica pode prejudicar a qualidade de vida e capacidade funcional do indivíduo, tendo consequências no âmbito social e econômico (ELLIOTT *et al.*, 1999; VARTIAINEN *et al.*, 2017). Associado a isso, os medicamentos atuais são restritos por problemas tais como efeitos secundários que limitam a dose, a tolerância, e o potencial de dependência (KING; VETTER, 2014). O dano celular característico no quadro de dor está associado a variações na temperatura ou ação mecânica, que liberam compostos como ácidos e capsaínas, além da prostaglandina e bradicinina, que são captados por receptores morfologicamente diferenciados, denominados nociceptores presentes em fibras do tipo A δ (mielinizada) e fibras C (não mielinizada) (BRANDÃO, 2008).

Os estímulos nocivos que causam dor são reconhecidos por tais terminais de fibras nervosas aferentes especializadas. Esses neurônios aferentes primários são

pseudounipolares e apresentam um único axônio com um ramo periférico que termina na pele ou vísceras e um ramo central que termina na medula espinhal. Os terminais periféricos destes neurônios são enriquecidos com canais especializados e receptores que transduzem estímulos mecânicos, ou produtos químicos endógenos e exógenos em estímulos elétricos, por meio da geração de um potencial de ação. Desta forma, os terminais periféricos são responsáveis pela conversão do estímulo ambiental em atividade neural, ou seja, transdução mecânica. Esta transdução é mediada por canais de íons e receptores especializados presentes nestes nociceptores, que não apenas os traduzem, mas também os transmitem a neurônios presentes no corno dorsal da medula espinhal. Estes estímulos geram um potencial de ação, que percorre todo o axônio e promove a abertura de canais de cálcio (do tipo N), levando ao seu influxo e conseqüentemente a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica e condução do impulso nervoso. O principal neurotransmissor liberado por fibras C é o glutamato (L-Glu), assim como na maioria de neurônios excitatórios (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os receptores de L-Glu podem ser do tipo metabotrópicos, quando estão acoplados a proteína G e mensageiros secundários, ou ainda receptores ionotrópicos, que são mais comuns, neste caso são dependentes da ligação de íons para seu funcionamento. Estes últimos são do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato) e AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), ou ainda, do tipo cainato (PURVES *et al.*, 2010). A lesão tecidual citada acima resulta na liberação de mediadores pró-nociceptivos que sensibilizam terminações nervosas periféricas, caracterizando a sensibilização periférica, mas também ocasionam alterações neuroquímicas e fenotípicas de neurônios sensoriais além de aumento na excitabilidade do corno dorsal da medula espinal de neurônios, configurando a sensibilização central (JULIUS; BASBAUM, 2001). Esta última pode ser produzida pela atividade em fibras sensoriais primárias não-nociceptiva (BOYCE-RUSTAY; JARVIS; J.M., 2009).

Considerando aspectos de modulação da dor, neurônios do córtex somatossensorial primário se projetam para o hipotálamo, e então, para as estruturas da via descendente inibitória da dor, como a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e núcleos da rafe. Desta forma, fibras serotoninérgicas se conectam com o corno dorsal da medula espinal, ativam interneurônios encefalinérgicos, inibindo o contato sináptico entre o primeiro neurônio e segundo neurônio da via ascendente (MILLAN, 2002), modulando a informação nociceptiva.

DN é associada a uma lesão ou doença no sistema nervoso (MANN *et al.*, 2012). Está associada a outras disfunções como DM, neuralgia pós-herpética, neuralgia trigeminal, dor regional complexa, acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, lesão medular, entre outras (Schestatsky, 2008)

A DN é caracterizada por uma reorganização de fibras e receptores, responsáveis pelo aumento da excitabilidade central e consequente persistência da sensação de dor. Há um aumento no número de receptores do tipo NMDA, os quais são amplamente encontrados em áreas corticais (METZ *et al.*, 2009).

De fato, a DN se manifesta através de alterações neuroquímicas no sistema nervoso central e periférico, afetando o nervo periférico, estruturas espinhais e corticais (YAN *et al.*, 2012). Na periferia, a DN está associada a alterações na excitabilidade dos nociceptores e, em nível de medula espinhal, a potenciação excitatória de longo prazo (LTP) (YAN *et al.*, 2012). Este aumento da excitabilidade é a causa de características importantes da DN como a resposta aos estímulos normalmente inócuos, caracterizando a alodínia, e o aumento da resposta evocada por estímulos nocivos, caracterizando a hiperalgesia (LENG *et al.*, 2012). Tais parâmetros são comumente observados em seres humanos e por tal motivos serão testados e observados em um modelo animal.

Na periferia, as lesões neuropáticas desencadeiam a sensibilização periférica que induzem uma atividade neural anormal de LTP ao longo das vias aferentes primárias (BASBAUM *et al.*, 2010). Na medula espinhal, os neurônios do corno dorsal exibem respostas excitatórias potenciadas e diminuição do limiar de disparo em resposta à dor (SANDKÜHLER, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2015).

A DN crônica pode ainda interferir em áreas cerebrais específicas envolvidas em processos neuropsicológicos dependentes de glutamato, como cognição, memória e tomada de decisão (WALKER *et al.*, 2014).

1.5 SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (SCP)

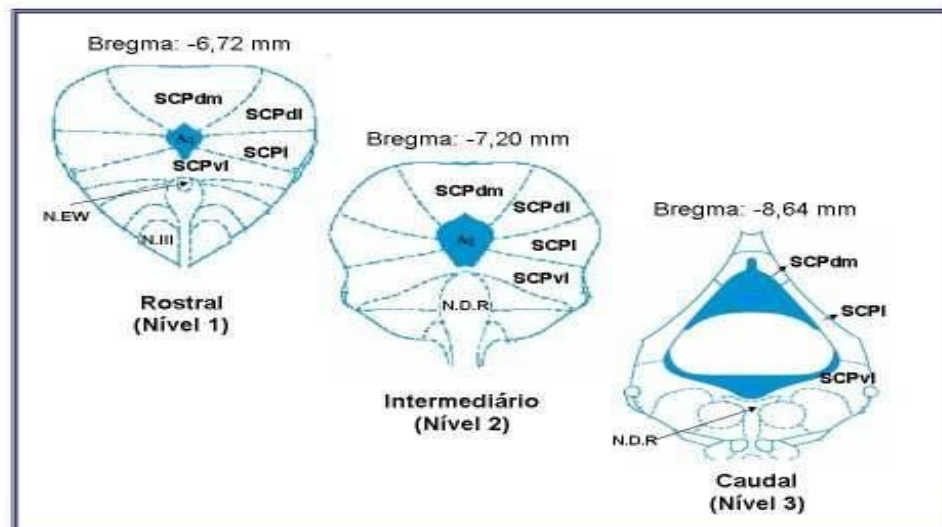
A SCP é contínua com a substância cinzenta periventricular e circunda o aqueduto do mesencéfalo, exceto a parte ventral, que contém núcleos relacionados ao oculomotor rostralmente e o núcleo dorsal da rafe caudalmente. A SCP foi subdividida em 4 colunas: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral. (BENARROCH, 2012)

A SCP contém diferentes tipos de neurônios que utilizam L-glutamato, ácido -aminobutírico (GABA), opioides (particularmente encefalina), substância P,

neurotensina e outros neurotransmissores. A SCP dorsolateral também contém neurônios que expressam NADPH-diaforase e sintetizam nítrico óxido (NO) (BENARROCH, 2012; ONSTOTT, 1993). Também na SCP há expressão abundante de NMDA (SIEGFRIED, 1989).

A SCP desempenha um papel importante na modulação e percepção da dor. Um dos primeiros estudos em humanos da SCP mostrou que a estimulação elétrica nesta área antes da cirurgia resultou na diminuição da necessidade de anestésicos. (ROIZEN, 1985) outro estudo confirma o papel de SCP na dor em humanos saudáveis que foram submetidos à investigação tomográfica por emissão de pósitrons (PET) do fluxo sanguíneo cerebral regional (rCBF), mostrou que a dor nociceptiva traumática aguda ativou proeminentemente o hipotálamo e a SCP (HSIEH, 1996). Muitos estudos experimentais em diferentes modelos animais também afirmam a atividade de esta área na modulação da dor. (BEHBEHANI *et al.*, 1990; BAPTISTA-DE-SOUZA *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; MCGARAUGHTY S. *et al.*, 2004).

Figura 2 - Áreas da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP)



Fonte: PAXINOS; WATSON, 2005 modificado por VIEIRA, (2007).

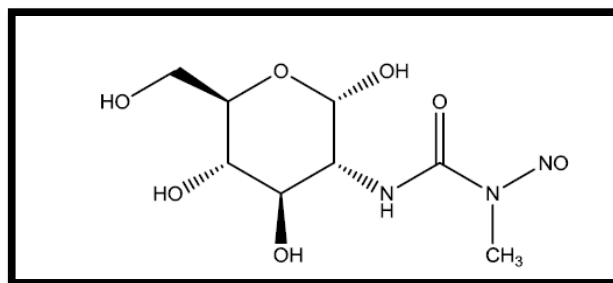
Legenda: Aq.: Aqueduto cerebral; N.E.W: núcleo de Edinger-Westphal; N.III: núcleo oculomotor; NDR: núcleo dorsal da rafe; SCPdm: coluna dorsomedial; SCPdl: coluna dorsolateral; SCPl: coluna lateral e SCPvl: coluna ventrolateral.

1.5 MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Estreptozotocina (STZ, 2- (3-(metil-3 nitrosoureido)-D-glucopiranosose) (figura 3), que é sintetizada de *Streptomicetos achromogenes* e é utilizada para estudar os

modelos de DM, insulina-dependente e não insulina-dependente. A ação da estreptozotocina nas células β é acompanhada por alterações características nas concentrações sanguíneas de insulina e glicose (SZKUDELSKI, 2001). Existem diversos tipos de modelos experimentais para os estudos das complicações de DM como é a ND, entre os modelos químicos mais utilizados são a STZ e aloxana, (RODRIGUES, 2018) que são utilizados comumente em ratas de linhagem Wistar. Porém, o modelo da STZ é a mais utilizada, as doses em ratos variam entre 40 e 75 mg/kg, sendo uma dose única via intraperitoneal que induz DM tipo 1 em ratos adultos (AL-MALKI; EL RABEY, 2015; ROCHA, 2017; DELFINO *et al.*, 2002; TACUAMAN, 2015;). A dose de 60 mg/kg de STZ, tem sido utilizada amplamente em estudos experimentais com ratos para induzir neuropatia diabética, sendo que no dia 14 após a administração de STZ pode-se comprovar a indução através de testes nociceptivos demonstrando uma alta efetividade para o estabelecimento prolongado da patologia, além de baixa taxa de mortalidade (BIANCHI *et al.*, 2004, 2007; DELFINO *et al.*, 2002; EL-AKABAWY; EL-KHOLY, 2014; FERREIRA, 2017; SILVIA *et al.*, 2011).

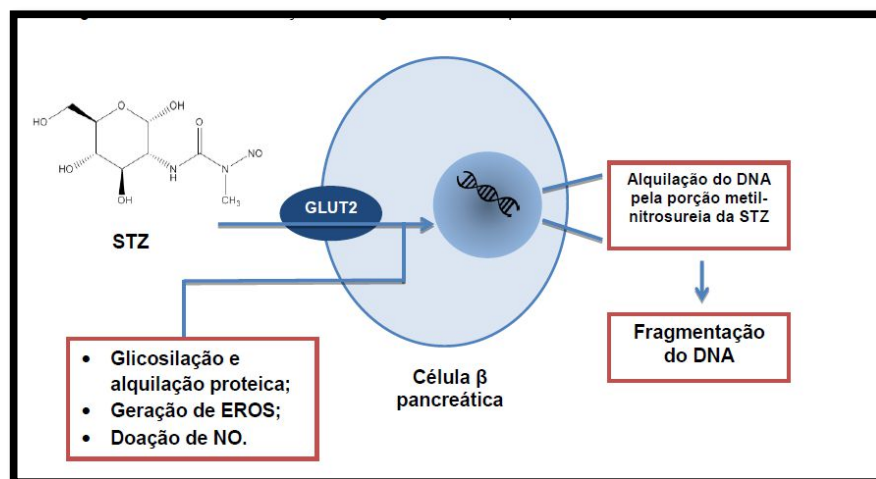
Figura 3 - Estrutura molecular de STZ



Fonte: FERREIRA, (2017).

Atualmente, assume-se que a ação diabetogênica da STZ (figura 3) é dependente dos seguintes mecanismos: 1) alquilação do DNA; 2) glicosilação e metilação de proteínas – fatores adicionais que contribuem para ação diabetogênica da STZ, mas que não desempenham um papel essencial; 3) geração de EROS, levando ao dano celular ao interagir com macromoléculas celulares; e 4) doação de óxido nítrico a partir do grupo nitrosureia de sua porção N-metil-N-nitrosureia (FERREIRA, 2017).

Figura 4 - Mecanismos de ação diabetogênicos da STZ



Fonte: FERREIRA, (2017), baseado em Al-Awar *et al.*, (2016).

1.6 MIGALINA

A Migalina é uma poliamina sintetizada a partir da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, foi identificada como bis-acilpoliamina N1, N8-bis (2,5 dihidroxibenzoil) espermidina, na qual os grupos amino primários da espermidina são acilados com o grupo carboxila do ácido 2,5 dihidroxibenzoico. (PEREIRA *et al.*, 2007). As Poliaminas são moléculas cujo grupamento amino é separado por cadeias metilênicas hidrofóbicas que participam de processos como a reparação da matriz extracelular, adesão celular e alguns processos de sinalização. São encontradas no espaço intracelular em razão de milimolar (CASERO; MARTON, 2007) e são obtidas por processos de biossíntese celular ou por captação do meio extracelular. As poliaminas naturais são a putrecina, espermina e espermidina. São encontradas em peçonhas de animais como aranhas e a primeira observação foi à interação destas com receptores na junção neuromuscular (ESTRADA; VILLEGAS; CORZO, 2007). Estudos posteriores mostraram que receptores glutamatérgicos, por exemplo, apresentam sítios de ligação de poliamina, as quais podem atuar como moduladores de tais receptores (BERGER *et al.*, 2013). A maioria dos agentes anestésicos atualmente utilizados é derivada ou associada a produtos naturais, especialmente de plantas como a cocaína, que foi isolada de *Erythroxylum coca* (Erythroxylaceae) e se tornou um protótipo de anestesia local; o timol e o eugenol, que foram isolados do tomilho (*Thymus vulgaris*, Lamiaceae) e cravo (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae), respectivamente. Ambos são estrutural e

mecanicamente semelhantes aos anestésicos fenólicos intravenosos atuais (TSUCHIYA *et al.*, 2017).

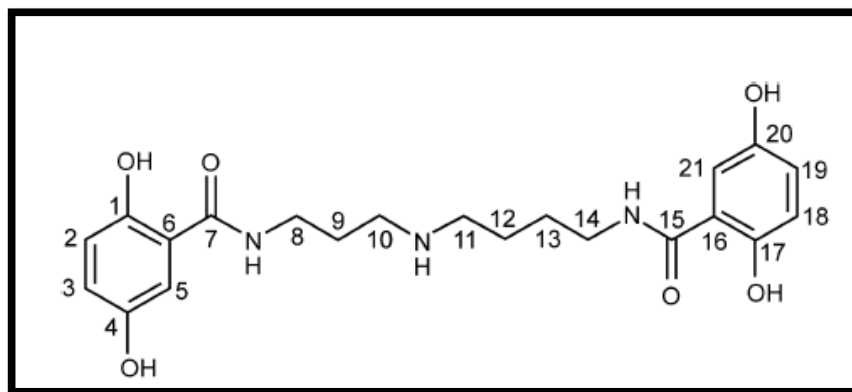
Um caso significativo para o potencial uso do veneno de Conoidean foi feito com o primeiro medicamento disponível no mercado conhecido como Ziconotide (Prialt®), um analgésico derivado do veneno de *Conus magus*, que é usado para tratar a dor crônica em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida e câncer (SOUSA *et al.*, 2017).

Os peptídeos de peçonhas de aranhas também têm sido utilizados como modelo para drogas, para o desenvolvimento de terapias contra uma ampla gama de condições fisiopatológicas, incluindo distúrbios cardiovasculares, dor crônica, inflamação e disfunção erétil (SAEZ *et al.*, 2010). Um exemplo de peptídeo de aranha é o Cd1a, isolado da peçonha de *Ceratogyrus darlingi*, inativa alguns canais de sódio (Nav) e cálcio (Cav) expressos nos músculos esqueléticos e cardíacos e nódulos de Ranvier. Aparentemente, em sua concentração eficaz não apresenta efeitos colaterais, sugerindo potencial efeito no tratamento de dor periférica.

Poliaminas têm sido amplamente estudadas uma vez que foi observado que estas moléculas interagem com receptores de L-Glu, particularmente os dos tipos ionotrópicos, atuando como antagonistas e moduladores destes receptores (STRØMGAARD; MELLOR, 2004; XIONG *et al.*, 2014). Diversas disfunções neurológicas estão associadas a receptores de L-Glu do tipo NMDA, este por sua vez apresenta sítios de ligação de poliaminas, que por sua vez atuam como moduladores de tais receptores (BERGER *et al.*, 2013).

Em um estudo onde a atividade biológica da poliamina sintética Migalina foi testada como anticonvulsivante em Ratos Wistar machos, apresentou proteção contra convulsões induzidas por ambas as injeções de NMDA e administração de pentilenetetrazol em 83,3% e 16,6%, respectivamente. Além disso, foi testado em cronograma neuroetológico avaliando possíveis efeitos colaterais e apresentou alterações leves nos testes Open Field, Rotarod e Morris Water Maze quando comparado aos anticonvulsivantes disponíveis. (GODOY *et al.*, 2013).

Figura 5 - Estrutura da Migalina N1, N8-bis (2,5 dihidroxibenzoil) espermidina



Fonte: PEREIRA *et al.*, (2007)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da microinjeção de migalina, na SCPdm sobre a DN crônica e ansiedade em ratos wistar com DM induzida por STZ.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a eficácia da administração de 60mg/kg de STZ na indução de DM tipo I em ratos Wistar adultos;
- b) Avaliar a indução de ND através dos testes de alodínia mecânica e alodínia ao frio;
- c) Avaliar três concentrações da migalina como efeito analgésico na ND crônica sobre a resposta de alodínia mecânica e alodínia ao frio;
- d) Determinar o efeito da migalina na SCPdm em relação de comorbidade entre DN crônica e ansiedade utilizando os testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

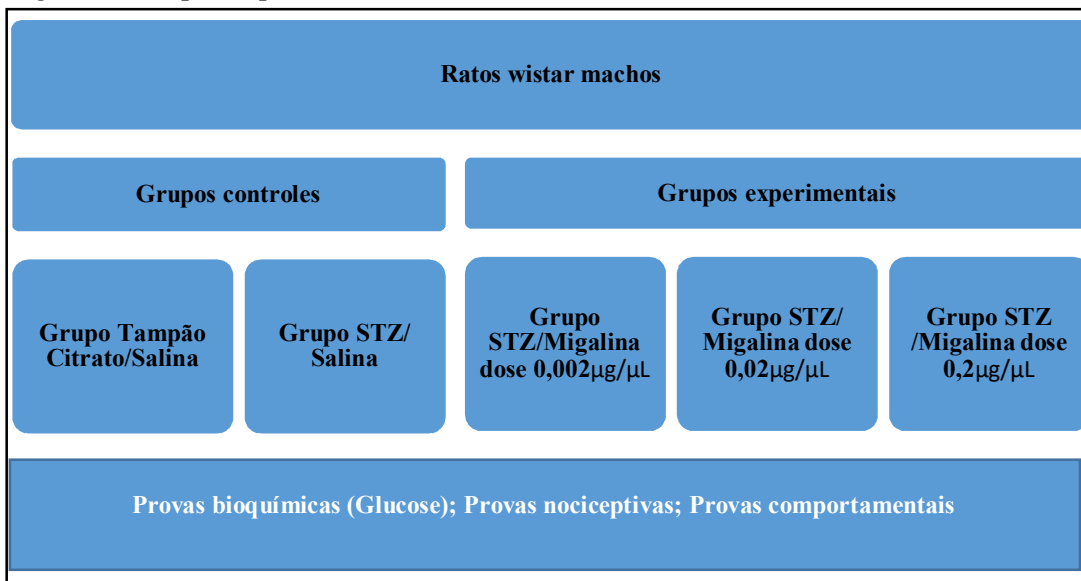
Para o modelo experimental foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) machos, adultos jovens (8 semanas) da linhagem “Wistar”, com pesos entre 200-300g. Todos os animais tiveram acesso a água e comida *ad libitum*. Além disso, os animais foram mantidos na temperatura média de 20°C e um ciclo de claro/escuro de 12/12 horas e aclimatados no laboratório pelo menos 24 horas antes dos procedimentos e testes. Todos os procedimentos de manipulação e experimentação foram feitos considerando os princípios determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA e em base ao Manual de normas e procedimentos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL, CEUA N° 07/2019).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram divididos em cinco grupos, cada grupo foi de 8 animais discriminados da seguinte maneira:

1. Grupo Tampão + Salina: Ratos Controle administrado com tampão citrato ip. e salina intra-SCPdm
2. Grupo STZ + Salina: Ratos Controle Neuropático diabético induzido com STZ ip. e tratado com salina intra-SCPdm.
3. Grupo STZ + migalina dose 0,002 µg/µL: Ratos neuropáticos diabéticos induzidos com STZ ip. e tratadas com dose 0,002 µg/µL de migalina intra-SCPdm.
4. Grupo STZ + migalina dose 0,02 µg/µL: Ratos neuropáticos diabéticos induzidas com STZ ip. e tratadas com dose 0,02 µg/µL de migalina intra-SCPdm.
5. Grupo STZ + migalina dose 0,2 µg/µL: Ratos neuropáticos diabéticos induzidos com STZ ip. e tratadas com dose 0,2 µg/µL de migalina intra-SCPdm.

Figura 6 - Grupos experimentais



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.3 INDUÇÃO DA DIABETES MELLITUS TIPO I

A DM tipo I experimental foi induzida com STZ (Sigma, St. Louis, EE.UU.), com uma dose única de 60 mg/kg de peso corporal, diluída em buffer citrato sódico 0.1M, pH 4.5 aplicado imediatamente, por via intraperitoneal (BIANCHI *et al.*, 2004, 2007; DELFINO *et al.*, 2002; EL-AKABAWY; EL-KHOLY, 2014; FERREIRA, 2017; SILVIA *et al.*, 2011) após jejum de 12 horas, e imediatamente foram fornecidos de ração e glicose ao 20% por 24h (MORA *et al.*, 2009). Decorridas as 24h, os animais foram mantidos com alimentação normal de ração e água *ad libitum*.

3.4 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE

Todos os ratos foram submetidos para a mostra de sangue, com prévio jejum de 12 horas, (todos os ratos submetidos a coleta de sangue, ficaram com prévio jejum de 12 horas). Semanalmente foram pesados e aplicados os testes de glicose como um controle de progressão da hiperglicemia, indicando o estabelecimento da DM.

Foram determinados os valores de glicose no sangue (glicose oxidase) com o aparelho de avaliação de glicose sanguínea onde a amostra de sangue foi retirada da cauda do animal (BEQUER *et al.*, 2016). Depois de 48 horas da administração da STZ (RODRIGUES, 2018), a glicose foi determinada para confirmar se estavam

normoglicêmicos ou não, e os animais cujos valores glicêmicos foram menores que 120mg/dl, ou que apresentavam glicemias intermediárias entre 120 e 200 mg/dl, com ou sem sinais clínicos de DM, foram desprezados (LERCO *et al.*, 2003).

3.5 IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA GUIA NA SCP E ADMINISTRAÇÃO DE MIGALINA

Foi realizada a cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula-guia no hemisfério esquerdo do animal. Através da cânula-guia, o fármaco é microinjetado na SCP com doses de Migalina de 0,002, 0,02 e 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, assim como a salina fisiológica (GODOY *et al.*, 2013). A Migalina (CHEBI:64901) foi fornecida pelo professor Dr. Pedro Ismael da Silva do Instituto de Butantan.

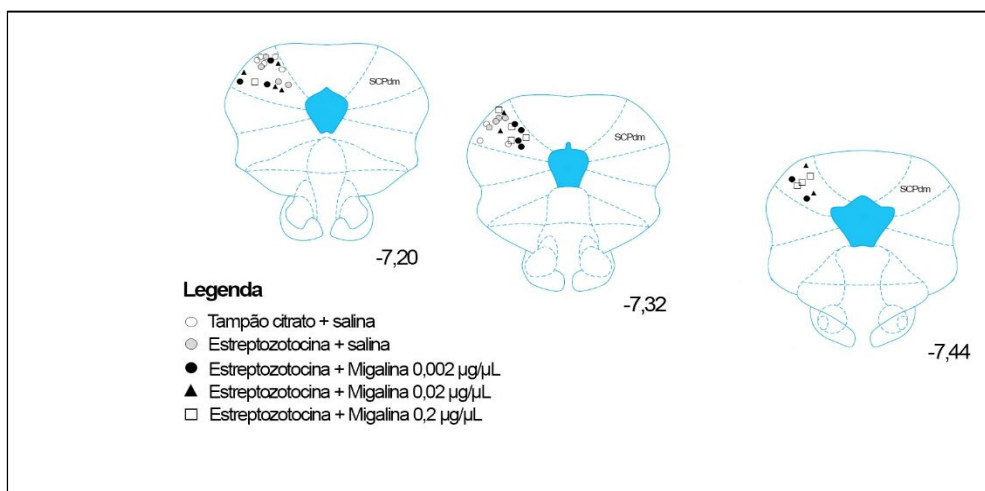
Os animais foram anestesiados através da administração por via peritoneal (IP) de uma solução na proporção de 0,2 ml de cetamina (92mg/kg) (Ketamina®) para 0,1ml de xilasina (9,2mg/kg) (Dopaser®). Após tricotomia na cabeça, os animais foram adaptados em um estereotáxico (Stoelting, USA) e a calota craniana foi exposta por uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada 10%. Todas as coordenadas têm como referência os parâmetros do atlas de Paxinos; Watson (1986), ajustados ao peso do animal. Na torre do estereotáxico foi posicionada uma cânula-guia, confeccionada a partir de agulhas de injeção hipodérmica (diâmetro externo= 0,6mm; diâmetro interno= 0,4mm), que foi implantada na substância cinzenta periaquedutal dorsomedial segundo as coordenadas AP= -7,68 mm, ML= +0,2 mm, DV= -2,6 mm, e tomando-se o bregma como referência, estando a sutura lambdoide e bregmática em um mesmo plano horizontal, e de acordo com o atlas de Paxinos; Watson (1986).

A cânula de aço inoxidável, de 11 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo, foi introduzida e direcionada na região dorsomedial da SCP esquerdo do animal por meio de um orifício, feitos com uma broca odontológica. A cânula foi fixada ao crânio com resina acrílica autopolimerizável, juntamente com um parafuso. Um mandril de 0,2 mm de diâmetro foi introduzido na cânula para evitar a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal.

3.6 DETERMINAÇÃO DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO DA DROGA NA SCPDM

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados (uretana 1,2 g/kg, i.p.) e 100 nL do corante azul de Evans (1%) foi microinjetado bilateralmente para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os encéfalos foram removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 50 µm de espessura com auxílio de um criostato (CM1900, Leica, Alemanha) para análise dos sítios de injeção.

Figura 7-Sítios de microinjeção da droga migalina na SCPdm

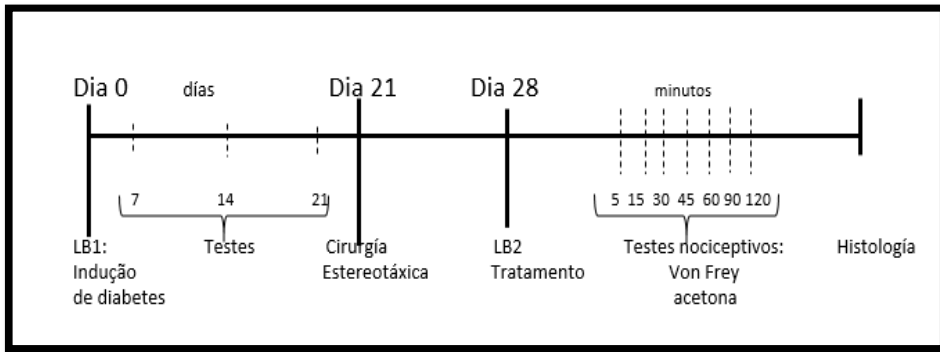


Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.7 TESTES NOCICEPTIVOS

Os testes nociceptivos foram aplicados aos ratos em cada semana para comprovar a indução de neuropatia diabética e registrar as alterações na percepção nociceptiva, para isso, foram usados os testes de alodínia mecânica com os filamentos *von frey*, e o teste de alodínia ao frio com acetona.

Figura 8-Figura representativa do procedimento experimental empregado no projeto, referente ao estudo do efeito da Migalina na dor neuropática crônica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.7.1 Teste de alodínia mecânica

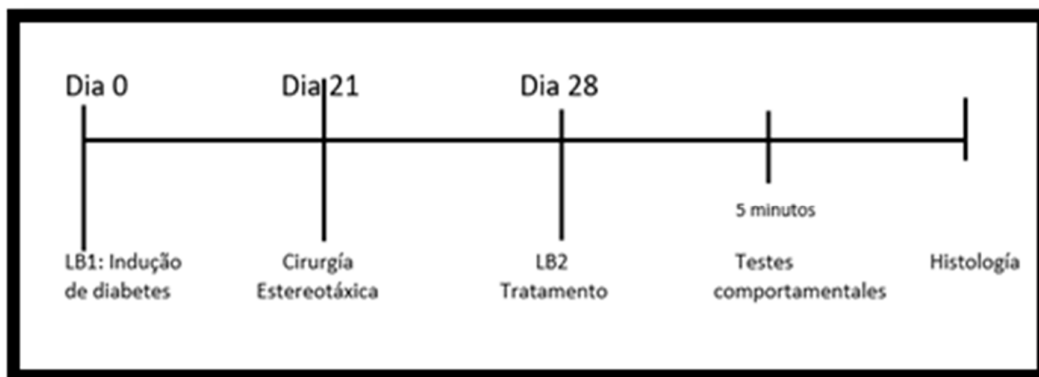
Todos os ratos foram submetidos ao teste de alodínia tátil, que foi determinada por a quantificação da retirada da pata, em uma resposta aos filamentos chamados de *von frey*. Os ratos foram colocados em câmaras individuais suspensas em um assoalho de malha e deixados para aclimatar por 30 minutos. O procedimento começou com o filamento de grau menor sendo aplicado com pressão suficiente na pata traseira do rato para causar retirada. A retirada rápida ou a contração da pata foi considerada como uma resposta positiva. Na ausência de uma resposta, o filamento da próxima força maior foi aplicado, e no caso da presença de uma resposta, o filamento da força mais baixa seguinte foi aplicado. Cada teste com os filamentos foi repetido duas a três vezes em intervalos de aproximadamente 2 min, e o valor médio foi usado (CHAPLAN *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2001).

3.7.2 Teste de alodínia ao frio

Para o teste de acetona os ratos foram posicionados sobre uma plataforma na qual se tem acesso à superfície inferior da pata do animal e então 0,5 mL de acetona a 100% foi administrada na superfície plantar da pata traseira do rato, a partir de baixo da grelha. O tempo gasto pelo animal lambendo ou mordendo a pata foi cronometrado durante 1 minuto e considerado indicativo de hipernocicepção (ELIAV *et al.*, 1999; PASZCUK *et al.*, 2007).

3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

Figura 9- Figura representativa do procedimento experimental referente ao estudo do efeito da Migalina na comorbidade entre dor neuropática crônica e ansiedade.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.8.1 Teste de labirinto em cruz elevado

O aparelho é feito de madeira (assoalho de madeira e paredes transparentes de vidro nos braços fechados) e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), unidos por uma plataforma central comum (5 x 5 cm) e elevado 38,5 cm do solo por um suporte de madeira.

Cada animal submetido ao LCE foi colocado sobre a plataforma central, com a cabeça voltada para um dos braços abertos e pôde explorar o aparelho por um período de 5 minutos.

Os comportamentos foram avaliados pela análise das sessões gravadas através de uma filmadora digital, usando o programa X-plorat 3.0. Os comportamentos registrados foram os parâmetros convencionais: frequência de entradas nos braços abertos e fechados (definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço) e tempo gasto nestes compartimentos.

Também como forma de análise complementar foram registradas o tempo de permanência do animal nas extremidades dos braços abertos e dos braços fechados.

3.8.2 Teste de campo aberto

O Teste de Campo Aberto ou Open Field (OF) é um teste validado para avaliação comportamental da ansiedade em modelos experimentais utilizando animais, o aparelho é um invólucro circular (97 cm de diâmetro, paredes de 32,5 cm de altura, tampo aberto, piso dividido em 19 partes similares) de cristal acrílico.

Cada animal foi gentilmente colocado no centro do recinto, e o comportamento foi filmado por 5 min. O teste avalia a nova exploração do ambiente e a atividade locomotora geral e fornece uma triagem inicial para o comportamento relacionado à ansiedade em roedores.

O animal foi colocado no centro, e a distância total percorrida da superfície foi registrada por médio de filmagem com câmara por 5 min, além de também ser analisado o comportamento de tempo de imobilidade do animal (WALSH; CUMMINS, 1976).

3.9. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Primeiramente foi feito uma análise de normalidade da variável glicemia através do teste de Kolgomorov-Smirnov, para conhecer a distribuição normal da variável e trabalhar com a média e desvio padrão ou mediana e quartis. Posteriormente os dados foram analisados com a prova paramétrica análise de variância (ANOVA) de duas vias e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, além das provas *post hoc* de Bonferroni e o programa estatístico para o processamento dos dados foi GraphPad Prism 5. Foi considerada uma significância de $p < 0,05$. O teste de homogeneidade de variância foi realizado com a estatística de Levene ($p < 0,05$) para comprovar se as variâncias são ou não homogêneas.

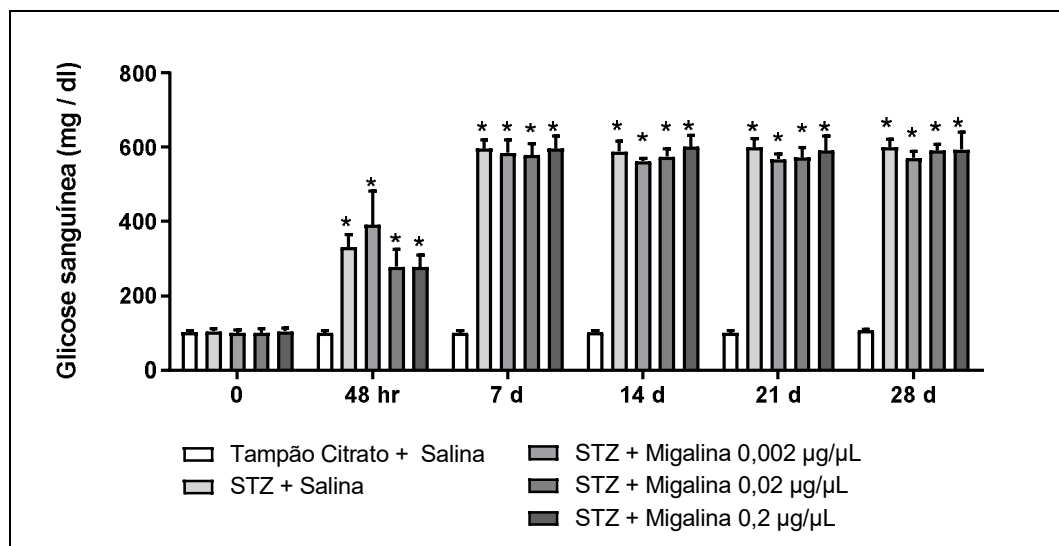
4 RESULTADOS

Foram analisados 40 ratos machos Wistar, com idade média de 8 semanas, peso entre 200 a 300gr, os animais foram distribuídos em 5 grupos contendo 8 animais por grupo. Os animais avaliados eram pertencentes ao grupo controle denominado Tampão Citrato + Salina, grupo controle neuropático diabético STZ + Salina, Grupo STZ + Migalina dose 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Grupo STZ + Migalina dose 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Grupo STZ + Migalina dose 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os dados obtidos foram dispostos em forma de gráficos.

Na análise do gráfico 1 foi observado que não foram encontradas diferenças significativas na linha de base 1 entre os grupos, que corresponde ao tempo 0. Desde os tempos 48hr, 7d, 14d, 21d e 28d houve diferenças significativas com o grupo controle, apresentando assim, altos níveis de glicose após a administração de STZ, o que indica a confiabilidade e eficácia do modelo para estabelecer condições em animais com DM I.

Os dados foram diferentes em relação ao tempo $F_{5,175}= 1337$, $p<0,001$; em relação aos tratamentos $F_{4,175}= 1093$, $p<0,001$ e na interação tempo x tratamento $F_{20,175}=87,73$, $p<0,001$.

Gráfico 1 - Medidas de Glicose no sangue durante 4 semanas de estudo.



Fonte:

Elaborado pelo autor (2021)

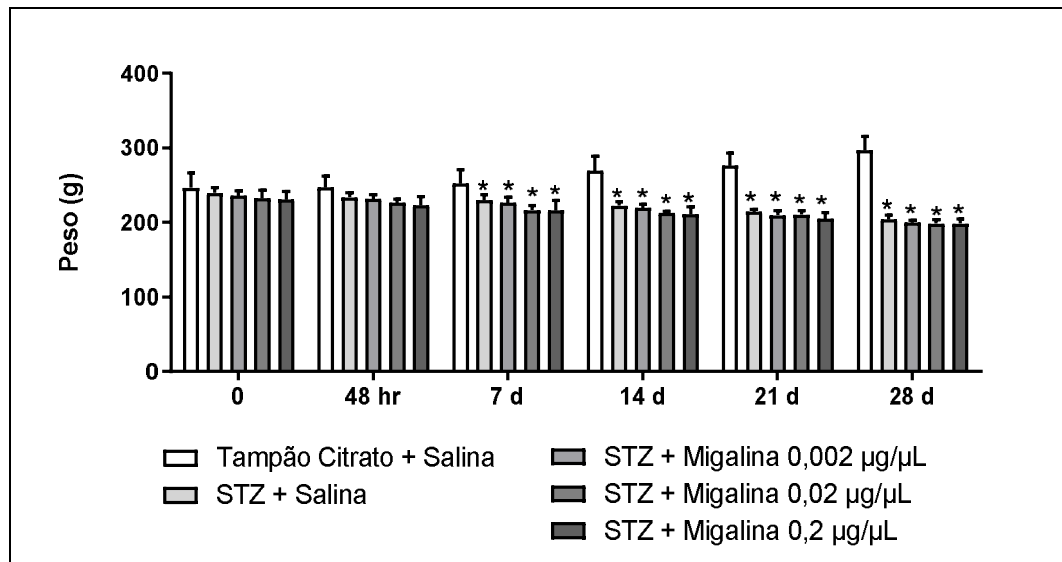
Legenda:

Avaliação de glicose em mg/dl, em seis diferentes momentos (dia 0, 48hr, 7d, 14d, 21d e 28d). Tampão Citrato + Salina, grupo controle negativo, STZ + Salina, grupo controle positivo neuropático diabético induzido por STZ (STZ), STZ + Migalina, grupos neuropáticos diabéticos induzido com STZ e administrados com três doses de Migalina 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ou 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo Tampão Citrato + Salina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *two way* ANOVA seguido de teste Bonferroni *post hoc* com uma significância de $p<0,05$.

No gráfico 2 podemos observar que não houve diferenças significativas nos pesos corporais iniciais entre os grupos ($p > 0,05$). Após a indução do DM, foram observadas diferenças no peso corporal entre ratos do grupo controle e os grupos tratados ($p < 0,05$) a partir do momento 7d. A queda do peso dos animais foi mantida durante a duração do estudo, indicando um sintoma típico de DM causado pela hiperglicemia induzida por STZ.

Os dados foram diferentes em relação ao tempo $F_{5,175} = 62,15$, $p < 0,001$; em relação aos tratamentos $F_{4,175} = 38,71$, $p < 0,001$ e na interação tempo x tratamento $F_{20,175} = 38,71$, $p < 0,001$.

Gráfico 2 - Medidas de Peso durante 4 semanas de estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Legenda: Avaliação do peso em gr, em seis diferentes momentos (dia 0, 48hr, 7d, 14d, 21d e 28d), Tampão Citrato + Salina, grupo controle negativo; STZ + Salina, grupo controle positivo neuropático diabético induzido por STZ; STZ + Migalina, grupos neuropáticos diabéticos induzido com STZ e administrado com Migalina em três diferentes doses 0,002 µg/µL 0,02 µg/µL ou 0,2 µg/µL. * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle Tampão Citrato + Salina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *two way ANOVA* seguido de teste Bonferroni *post hoc* com uma significância de $p < 0,05$.

O gráfico 3 foi analisado denotando que todos os grupos na primeira medição correspondente a linha de base 1 ou LB1 (antes da administração de STZ), não demonstraram diferenças entre eles, conservando os limiares similares ante o estímulo dos filamentos de *von Frey*. No caso da linha de base 2 ou LB2 que corresponde a um tempo de 28 dias após administração da STZ via intraperitoneal, corroboraram uma

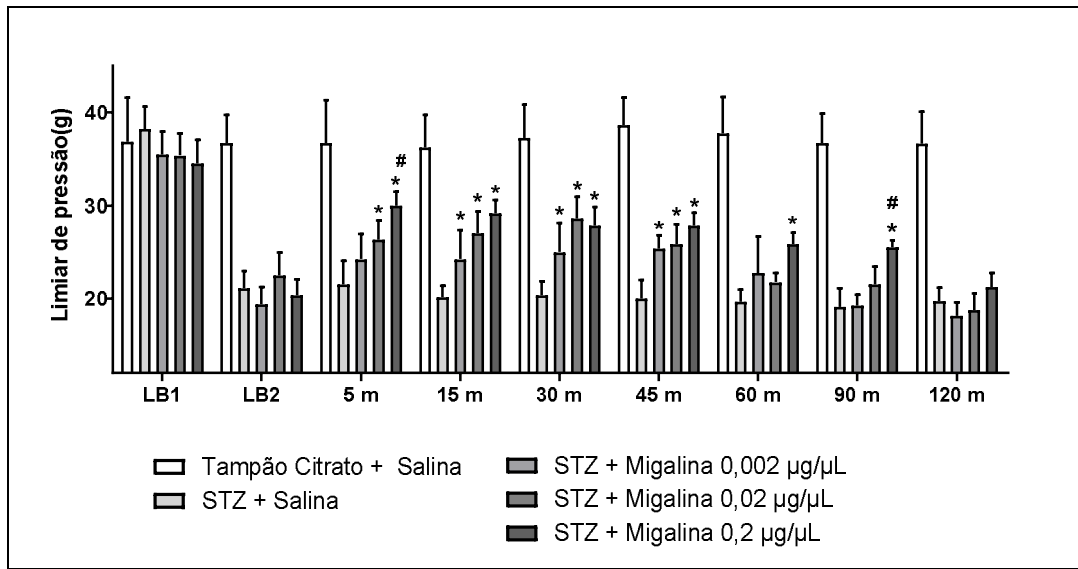
diminuição considerável dos limiares nociceptivos dos grupos tratados com STZ ante o teste de *von Frey* em comparação com o grupo controle, confirmando assim, o estabelecimento de neuropatia diabética crônica nos animais pela administração de STZ.

O teste de *von Frey* foi executado novamente após administração de Migalina com doses de 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ou 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ na SCPdm, correspondente aos três grupos diferentes tratados. No tempo 5m, as doses de 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tiveram diferença em relação ao grupo controle neuropático diabético STZ + salina e a dose maior de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentou diferença significativa com os grupos tratados com Migalina. Nos tempos 15, 30 e 45m, todos os grupos tratados apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo STZ + salina. A dose maior de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi a única que manteve uma prevalência nos tempos de 60 e 90m apresentando diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle neuropático.

O grupo controle (Tampão Citrato + salina) conservou uma prevalência significativa sobre os demais grupos, já que os grupo com tratamento de Migalina não conseguiram reverter as respostas neuropáticas, porém, todos eles apresentam índice de melhora o que pode ser um indicativo de ajustar e testar novas doses.

Os dados foram diferentes em relação ao tempo $F_{8,280}= 123,2$, $p<0,001$; em relação aos tratamentos $F_{4,280}=150,9$, $p<0,001$ e na interação tempo x tratamento $F_{32,280}=13,72$, $p<0,001$.

Gráfico 3 - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste von Frey.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

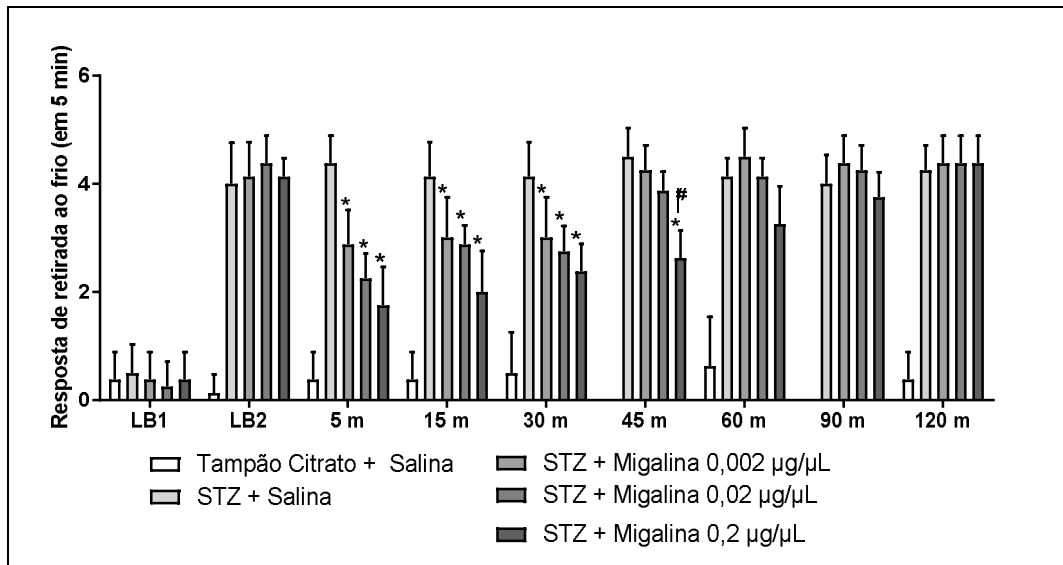
Legenda: LB1 (antes da indução da DM com STZ 60mg/Kg), LB2 para confirmar dor neuropático diabético crônico (dia 28 antes da administração de Migalina) e avaliação nos tempos 5,15,30,45,60,90 e 120 minutos após administração de 0,002 µg/µL 0,02 µg/µL ou 0,2 µg/µL de Migalina na SCPdm. * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle STZ + Salina, # denota uma diferença entre grupos tratados com Migalina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *two way* ANOVA seguido de teste Bonferroni *post hoc* com uma significância de $p < 0,05$.

Foram analisados os grupos submetidos a estimulação térmica de frio ou “cold” com aplicação de acetona na pata traseira, representados no gráfico 4, apresentando limiares sem alteração para o grupo controle Tampão Citrato + salina em todos os momentos avaliados, LB1, LB2 e nos tempos 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, mantendo sua prevalência estatística sobre os demais grupos.

Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados com três diferentes doses 0,002 µg/µL 0,02 µg/µL ou 0,2 µg/µL em relação ao grupo controle neuropático STZ + salina, onde os grupos com tratamento de Migalina apresentaram menor resposta ao estímulo térmico de frio, indicando uma melhoria do seu limiar nociceptivo, mas sem diferença alguma entre eles. As diferenças entre o grupo STZ + salina foram encontradas apenas nos primeiros momentos 5m, 15m e 30m, no entanto a dose maior de 0,2 µg/µL conseguiu atingir resultados similares até o momento 45m, manifestando uma diferença significativa entre grupos tratados e grupo controle neuropático, o STZ+ salina. Posteriormente houve uma queda nos limiares seguintes até atingir níveis similares do que STZ + salina.

Os dados foram diferentes em relação ao tempo $F_{8,280}=127,1$, $p<0,001$; em relação aos tratamentos $F_{4,280}=460$, $p<0,001$ e na interação tempo x tratamento $F_{32,280}=14,16$, $p<0,001$.

Gráfico 4 - Avaliação térmica de dor pelo teste *Cold*



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

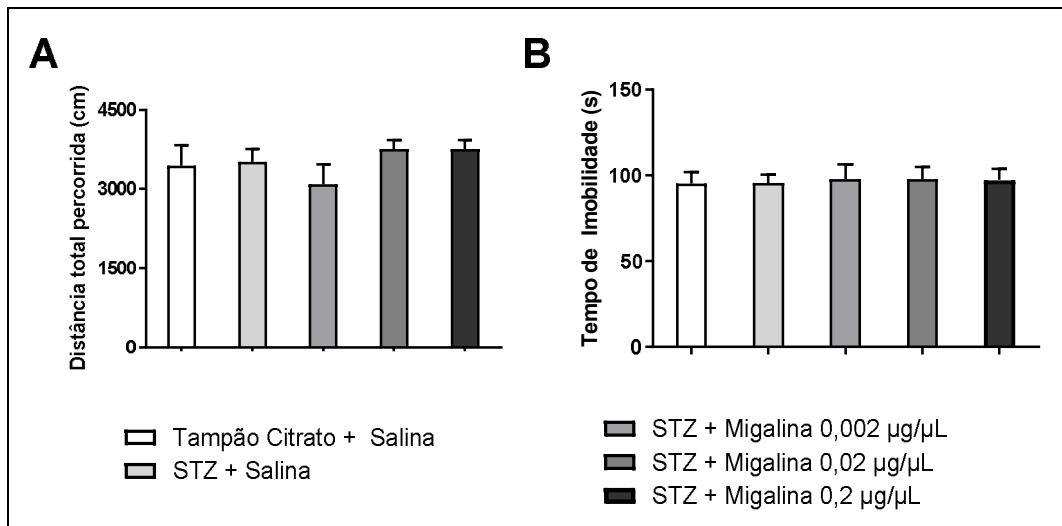
Legenda: LB1 (antes da indução da DM com STZ 60mg/Kg), LB2 para confirmar dor neuropático diabético crônico (no dia 28 antes da administração de Migalina) e nos tempos 5,15,30,45,60,90 e 120 minutos após administração de 0,002µg/µL, 0,02 µg/µL ou 0,2µg/µL de Migalina na SCPdm. *Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle STZ +Salina, #denota uma diferença entre grupos tratados com Migalina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste two way ANOVA seguido de teste Bonferroni post hoc com uma significância de $p<0,05$.

No gráfico 5 foram analisados dados para determinar atividade locomotora dos animais, utilizando o teste de campo aberto ou “*open field*” após injeção de três doses de Migalina 0,002 µg/µL 0,02 µg/µL ou 0,2 µg/µL.

Foram avaliados a distância total percorrida e o tempo de imobilidade, e os grupos não apresentaram nenhuma diferença significativa entre eles, o que indica que não foi possível identificar diferenças entre as atividades locomotoras dos animais e a droga administrada também não teve algum envolvimento no comportamento locomotriz.

A análise de variância (Kruskal-Wallis) não verificou diferenças significativas sobre a distância percorrida no campo aberto, $p>0,05$.

Gráfico 5 - Avaliação de comportamento tipo ansioso por atividade locomotora no teste de campo aberto “*open field*”



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)
 Legenda: Avaliação locomotora após administração de 0,002 µg/µL 0,02 µg/µL ou 0,2µg/µL de Migalina na SCPdm e gravado por 5 minutos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *one way* ANOVA (kruskal-wallis) com uma significância de $p < 0,05$.

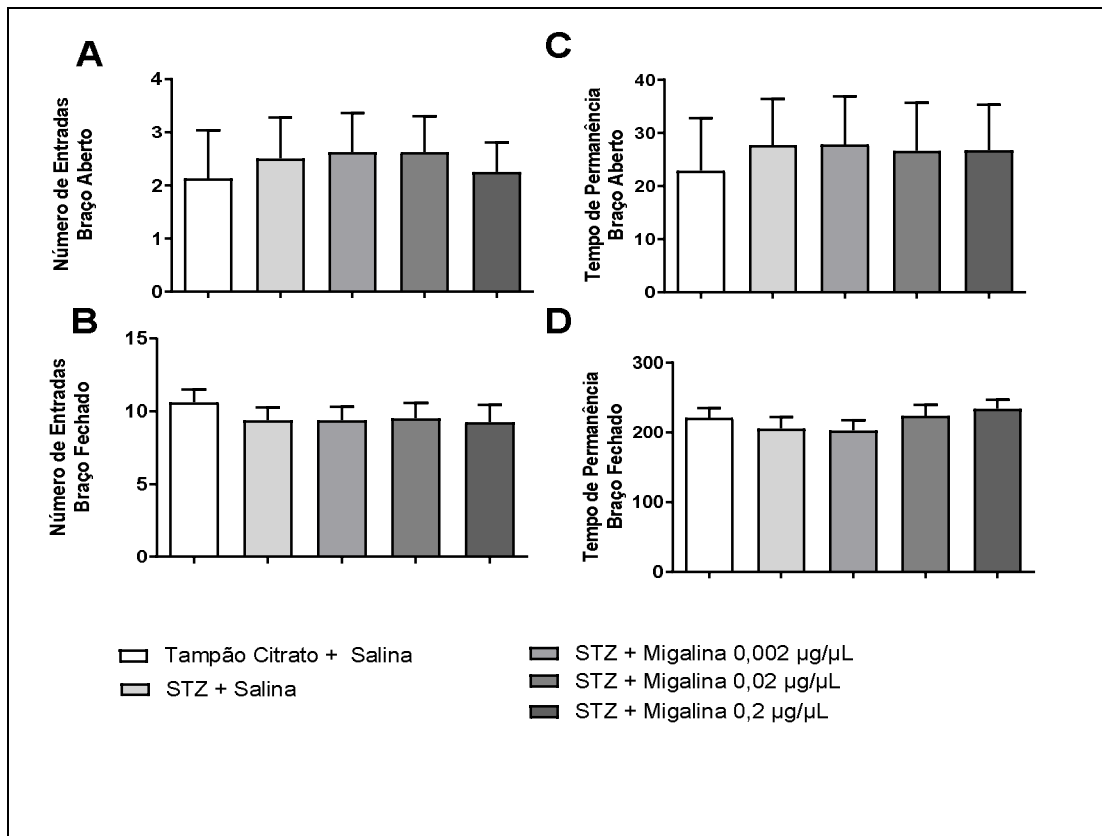
No gráfico 6 foram submetidos os grupos com o teste de labirinto em cruz elevado (LCE), para determinar comportamento tipo ansioso, avaliando-se os parâmetros de: número de entradas no braço aberto, número de entradas no braço fechado, tempo de permanência no braço aberto e tempo de permanência no braço fechado.

O comportamento dos animais foi homogêneo, não apresentando diferenças significativas nos seus comportamentos tipo ansioso para todos os grupos, indicando também, que a Migalina administrada na SCPdm não teve efeito sobre estes.

A análise de variância (Kruskal-Wallis) não verificou diferenças significativas sobre o número de entradas no braço aberto, e no braço fechado no teste de labirinto em cruz elevado, $p > 0,05$ ”

A análise de variância (Kruskal-Wallis) não verificou diferenças significativas sobre o tempo de permanência no braço aberto e no braço fechado no teste de labirinto em cruz elevado, $p > 0,05$.

Gráfico 6 - Avaliação de comportamento tipo ansioso por atividade de exploração nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado



Fonte:

Elaborado pelo autor (2021)

Legenda:

Avaliação do comportamento tipo ansioso após administração de 0,002 µg/µL, 0,02 µg/µL ou 0,2 µg/µL de Migalina na SCPdm e gravado por 5 minutos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *one way* ANOVA com uma significância de $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados evidenciaram que a administração da STZ como um modelo de indução de ND foi efetiva e conservada durante todo o processo de experimentação, apresentando níveis altos de hiperglicemia, diminuição do peso corporal e diminuindo o limiar doloroso ante os estímulos nociceptivos mecânico de *von Frey* e térmico “*cold*”. Por outro lado, as doses de Migalina administrada na SCPdm, mostraram indícios de melhora ao incrementar os limiares da dor neuropático diabético frente aos testes neuropáticos.

A estreptozocina (2-desoxi-2 (3-metil-3-nitro shureido)-D-glucopiranoose) é sintetizado por *Streptomyces achromogenes* e é um agente antineoplásico, clinicamente classificado como antibiótico e quimicamente análogo aos quimioterápicos nitrosoureas, este químico é bem conhecido por causar danos às células B pancreáticas. (SZKUDELSKI, 2001; SOUSA *et al.*, 2016; ADEGHATE; PONERY, 2002; WILSON, 1984). Um estudo sistemático mostrou que um dos fármacos mais utilizados para indução de DM tipo I em roedores, é a STZ (RODRIGUES *et al.*, 2009), revelando quadro caracterizado por redução na velocidade da condução nervosa e do limiar da dor (WALKER *et al.*, 1999). A dose utilizada no estudo foi de 60 mg/Kg de STZ, essa dose causou DM severo, e de longa duração em ratos Wistar, da mesma forma que descrito em outros estudos. (DELFINO *et al.*, 2002; AKBARZABETH *et al.*, 2007; FERREIRA, 2017; SZKUDELSKI, 2012).

O DM apresenta diversas mudanças em função de suas alterações patológicas, algumas das alterações observadas foram físicas como o peso dos animais, apresentando uma queda na média do peso no decorrer do estudo após a administração de STZ, do mesmo jeito, alterações no fator bioquímico da glicemia apresentou níveis altos, todas essas complicações foram contrastadas com o grupo controle Tampão Citrato + salina, assim, esses achados são similares e complementários do que foi relatado em outros estudos. (FERREIRA, 2017; VIERA, 2010; AKBARZADEH *et al.*, 2007).

A DN diabética é uma complicação comum do DM e a forma mais comum de dor neuropática (SCHREIBER *et al.*, 2015), e umas das características apresentadas no presente trabalho foi a diminuição do limiar à sensibilidade com os filamentos de *von Frey*, o que confirma a presença das alterações neuropáticas, o que corrobora e concorda com os achados em outros estudos como de Fox e colaboradores em 1999, onde ratos *sprague dawley* induzidos com STZ apresentaram uma redução significativa no limiar

nociceptivo mecânico 8 dias após indução, e se tornou mais pronunciado com o tempo, atingindo um máximo em 3 semanas com uma redução de 37% no limite de retirada da pata. Estudos recentes em ratos Wistar machos e fêmeas foi observada uma diminuição do limiar de sensibilidade mecânica nos grupos de animais tratados com STZ na primeira semana após o tratamento, quando comparado ao grupo controle (RODRIGUES, 2018; ROCHA, 2017)

Além do estímulo mecânico, foi avaliada a resposta ao estímulo térmico “cold” com aplicação da acetona na pata traseira, mostrando resposta e eventos nociceptivos frente ao estímulo, o que significa uma clara alteração nas respostas causadas por mudanças nos limiares dolorosos dos nervos periféricos, sinais que indicam manifestação de neuropatia diabética dolorosa, de igual forma, um estudo de 4 semanas em ratos wistar com DM induzido com STZ mostraram diferença significativa quanto ao número de eventos nociceptivos desencadeados após a instilação de acetona quando comparado ao grupo normoglicêmico (ALVES, 2015).

A SCP é a principal estrutura encarregada da modulação da dor, enviando projeções até o corno dorsal da medula espinhal, constituindo assim, uma das principais vias descendentes no controle da dor (STAMFORD 1995, OSSIPOV *et al.*, 2010). Os achados em este estudo, corroboram a participação da SCPdm quando microinjetado com Migalina em concentrações de 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, melhorando as respostas ante os estímulos térmicos e mecânicos, nessa sequência, um estudo em humanos, mostrou que a conectividade funcional SCP ventrolateral é alterada em pacientes que sofrem de polineuropatia diabética dolorosa; cuja magnitude está correlacionada à sua dor espontânea e alodínica. Os autores postulam que a disfunção do sistema modulador da dor descendente mediada por SCP ventrolateral pode refletir um mecanismo de facilitação da dor baseado no cérebro, contribuindo para a polineuropatia diabética dolorosa. (SEGERDAHL *et al.*, 2018). Um estudo em ratos Wistar diabéticos induzidos por STZ, e tratados 4 semanas depois com Gabapentina, mostrou que os efeitos da droga na reversão dos sinais comportamentais de neuropatia diabética e hiperatividade neuronal na medula espinhal e SCP, reforçam as causas centrais da neuropatia diabética e apontam para os alvos centrais da droga (MORGADO *et al.*, 2010).

A Migalina é uma poliamina sintetizada a partir da molécula natural presente na hemolinfa de aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Pereira *et al.*, 2007) assim, as

poliaminas interagem com receptores L-Glu preferentemente com aqueles do tipo ionotrópicos (XIONG *et al.*, 2014).

Por outro lado, os receptores L-Glu do tipo NMDA, apresentam sítios de ligação de poliaminas, atuando como moduladores de tais receptores. Um estudo com Migalina, concluiu que tem efeito anticonvulsivante em animais induzidos por pentilenotetrazol (PTZ) e NMDA, mostrando maior efeito sobre este último (GODOY *et al.*, 2013).

Neste sentido, pode-se sugerir que a partir da interação das poliaminas e também da Migalina especificamente, sobre os receptores tipo NMDA, é possível sua participação na modulação da dor e agir como um possível terapêutico. O presente estudo apresenta que a aplicação de Migalina na SCPdm, contribuiu para reduzir as respostas nociceptivas frente aos estímulos térmico “cold” e mecânico *von Frey*, aumentando os limiares de dor apenas nos primeiros momentos com as doses de 0,002 µg/µL e 0,02 µg/µL, e a dose de 0,2 µg/µL apresentou um efeito mais prolongado, atingindo até o tempo 90m no teste de *von Frey* e no caso do teste de acetona chegando os 45 minutos.

Podemos dizer que a droga tem potencial analgésico quando microinjetada na SCPdm, tendo possível efeito bloqueador nos receptores de tipo NMDA em ratos com dor neuropática diabética, visando para estudos posteriores o esclarecimento dos mecanismos de interação neuro-farmacológica e procura de doses mais efetivas para o controle de dor neuropático de origem diabético.

A Diabetes é uma patologia associada a múltiplas complicações sistêmicas, que está fortemente vinculada ao aparecimento de transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão. Diversos estudos em humanos corroboram e identificam transtornos de ansiedade em pacientes com DM tipo I e tipo II (AMIRI; BENNEZHAD, 2019; SMITH *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2018). A DM também apresenta complicações frequentes como Neuropatia diabética dolorosa, sendo um agravante para as complicações de transtornos de ansiedade e depressão, identificando assim um eixo de DM, Neuropatia e Ansiedade/Depressão (GIRACH *et al.*, 2019; BRASIL; PONDE, 2009).

Por outro lado, os estudos animais ainda suportam o vínculo estreito entre as patologias de DM e ansiedade, manifestando que existe uma alta prevalência por esse transtorno de comportamento tipo ansioso, portanto, estudos experimentais com ratos machos e fêmeas com DM induzida por STZ, apresentaram aparição de comportamento tipo ansioso no teste de campo aberto de areia (*open field sand*) ao mostrar-se menos tempo no centro do campo, do mesmo modo, quando avaliados com o teste de labirinto

em cruz elevado (LCE) revelaram maior tempo de permanência no braço fechado, denotando da mesma forma do que o campo aberto um comportamento tipo ansioso (AKSU *et al.*, 2012; ATES *et al.*, 2013). Outro estudo em camundongos machos e fêmeas com neuropatia induzido por SNI (*spread nerve injury*) demonstrou um forte vínculo entre dor neuropática e ansiedade. Um outro estudo com ratos sprague dawley com dor neuropático diabético induzidas com STZ, revelou que a DM induziu comportamento tipo ansioso evidenciado no teste de *open field*, reduzindo a porcentagem do tempo na área central assim também como o número de entradas, além de uma diminuição na atividade locomotora. No teste de labirinto permaneceram menos tempo no braço aberto, assim como o número de entrada (ALBA-DELGADO *et al.*, 2016).

De tal modo, os achados do presente estudo contradizem o que foi relatado nos estudos anteriormente citados, já que não foi possível identificar diferenças entre os comportamentos tipo ansioso entre os grupos de estudos, relatando-se sem diferenças estatisticamente significativas para todos os parâmetros considerados entre todos os grupos.

Neste estudo não foram analisados todos os parâmetros padrões para determinar comportamento tipo ansioso em animais utilizando o teste de campo aberto, de tal modo, é recomendável para estudos futuros, realizar análises dos fatores de comportamento tipo ansioso no teste de campo aberto para obter uma melhor descrição da interação entre comorbidades.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos se conclui o seguinte:

- A administração de STZ induz e estabelece com eficiência o DM tipo I em ratos Wistar, apresentando altos níveis de hiperglicemia e emagrecimento.
- O estabelecimento da ND em ratos Wistar utilizando STZ foi confirmado como um modelo para o estudo desta patologia, apresentando alteração na avaliação de alodínia mecânica por *von Frey* e hipernocicepção de ao frio com teste de acetona.
- As doses de 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Migalina aplicada na SCPdm, promoveu um aumento do limiar nociceptivo significativo quando comparados com o grupo neuropático diabético, porém, não reverte a alteração neuropática para atingir os níveis normais do grupo controle, mas deixa-nos indícios de possível efeito na redução da percepção dolorosa utilizando e testando doses mais adequadas.
- Não houve relação entre a dor neuropático e ansiedade, pois não foi identificado comportamento tipo ansioso nos animais quando submetidos aos testes de campo aberto (*open field*) e labirinto em cruz elevado (LCE), além disso, a administração da migalina na SCPdm não alterou os comportamentos dos animais.

REFERÊNCIAS

ADEGHATE, E.; PONERY, A. S. GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. **Tissue and Cell**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 1-6, 2002.

AKBARZADEH, Azim *et al.* Induction of diabetes by streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, [s.l.], v. 22, n. 2, p. 60-64, 2007.

AL-MALKI, Abdulrahman L.; EL RABEY, Haddad A. The antidiabetic effect of low doses of Moringa oleifera Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. **BioMed research international**, London, v.2015, p.1-13, 2015.

ALBA-DELGADO, Cristina *et al.* Comorbid anxiety-like behavior and locus coeruleus impairment in diabetic peripheral neuropathy: a comparative study with the chronic constriction injury model. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 71, p. 45-56, 2016.

ÁLVAREZ, F.; BLANCO, E.; SÁNCHEZ, J. Guía de Buena Práctica Clínica en: Dolor neuropático en el paciente diabético. 2012.

ALVES, C. H. **Responsividade dos receptores TRPM8 e TRPA1 no diabetes experimental induzido por estreptozotocina em ratos**. 2015. 35f. Tese (Doutorando em: Ciências Biológicas do Setor de Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2015.

AMIRI, Sohrab; BEHNEZHAD, Sepideh. Diabetes and anxiety symptoms: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Psychiatry in Medicine**, [s.l.], v.0, n. 0, p. 1-14, 2019.

ASP Terminology-IASP. <https://www.iasp-pain.org/terminology?navItemNumber=576#Neuropathicpain>. Accessed: 2020-11-02.

BALHARA, Yatan Pal Singh; SAGAR, Rajesh. Correlates of anxiety and depression among patients with type 2 diabetes mellitus. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, Mumbai, v. 15, n. 5, p. 50, 2011.

BAPTISTA-DE-SOUZA, Daniela *et al.* Interplay between 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray in the modulation of fear-induced antinociception in mice. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 140, p. 100-106, 2018.

BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **NIH Public Access**, [s.l.], v. 139, n. 2, p. 267–284, 2010.

BASTÍAS, A. *et al.* La insulino-terapia intensificada más antineuríticos es superior a antineurítico puro en neuropatía diabética dolorosa. **Revista médica de Chile**, Santiago, v. 134, n. 12, p. 1507-1515, 2006.

BEHBEHANI, Michael M. *et al.* The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. **Pain**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 195-204, 1990.

BENARROCH, Eduardo E. Periaqueductal gray: an interface for behavioral control. **Neurology**, [s.l.] v. 78, n. 3, p. 210-217, 2012.

BEQUER, Leticia *et al.* Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. **Biomédica**, Bogotá, v. 36, n. 2, p. 230-238, 2016.

BERGER, M. L. *et al.* Exploring the Polyamine Regulatory Site of the NMDA Receptor: A Parallel Synthesis Approach. **ChemMedChem**, Weinheim, v. 8, n. 1, p. 82–94, 2013.

BIANCHI, Roberto *et al.* Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 101, n. 3, p. 823-828, 2004.

BOUHASSIRA, Didier; LETANOUX, Martine; HARTEMANN, Agnès. Chronic pain with neuropathic characteristics in diabetic patients: a French cross-sectional study. **PLoS One**, California, v. 8, n. 9, p. 74195, 2013.

BOULTON, A. J. M.; GRIES, F. A.; JERVELL, J. A. Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetic Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 508-514, 1998.

BOULTON, Andrew JM *et al.* Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes care**, [s.l.], v. 28, n. 4, p. 956-962, 2005.

BOYCE-RUSTAY, J. M.; JARVIS, M. F.; J.M., B.-R. Neuropathic pain: Models and mechanisms. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 15, n. 15, p. 1711–1716, 2009.

BRANDÃO, M. As bases biológicas do comportamento. [s.l: s.n.]. 2008

BRASIL, Israel Soares Pompeu De Sousa; PONDÉ, Milena Pereira. Sintomas ansiosos e depressivos e sua correlação com intensidade da dor em pacientes com neuropatia periférica. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 31, n. 1, p. 24–31, 2009.

BYSTRITSKY, Alexander; DANIAL, Jessica; KRONEMYER, David. Interactions between diabetes and anxiety and depression: Implications for treatment. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Atlanta, v. 43, n. 1, p. 269–283, 2014.

CAMERON, Linda D.; YOUNG, Marie J. e WIEBE, Deborah J. Maternal trait anxiety and diabetes control in adolescents with type 1 diabetes. **Journal of Pediatric Psychology**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 733–744, 2007.

CASERO, R. A.; MARTON, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 373–390, 2007.

CASTRO, Martha M.C. *et al.* Comorbid depression and anxiety symptoms in chronic pain patients and their impact on health-related quality of life. **Archives of Clinical Psychiatry**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 126–129, 2011.

CASTRO, Martha Moreira Cavalcante *et al.* Validade da escala hospitalar de ansiedade e depressão em pacientes com dor crônica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, São Paulo, v. 56, n. 5, p. 470–477, 2006.

CHAPLAN, S. R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 53, n. 1, p. 55–63, 1994.

CHIEN, I. Chia; LIN, Ching Heng. Increased risk of diabetes in patients with anxiety disorders: A population-based study. **Journal of Psychosomatic Research**, [s.l.], v. 86, p. 47–52, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychores.2016.05.003>>.

COLLINS, M. M.; CORCORAN, P.; PERRY, I. J. Anxiety and depression symptoms in patients with diabetes: Original Article: **Psychology. Diabetic Medicine**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 153–161, 2009.

DE OLIVEIRA, Ricardo *et al.* 5-Hydroxytryptamine_{2A/2C} receptors of nucleus raphe magnus and gigantocellularis/paragigantocellularis pars α reticular nuclei modulate the unconditioned fear-induced antinociception evoked by electrical stimulation of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal grey matter. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 316, p. 294–304, 2017.

DELFINO, Vinicius DA *et al.* Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras Nefrol**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 31–6, 2002.

EL-AKABAWY, Gehan; EL-KHOLY, Wael. Neuroprotective effect of ginger in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, [s.l.], v. 196, n. 2–3, p. 119–128, 2014.

ELIAV, Eli *et al.* Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. **Pain**, [s.l.], v. 83, n. 2, p. 169–182, 1999.

ELLIOTT, A. M. *et al.* The epidemiology of chronic pain in the community. **Lancet**, London, v. 354, n. 9186, p. 1248–52, 1999.

ENGUM, Anne. The role of depression and anxiety in onset of diabetes in a large population-based study. **Journal of Psychosomatic Research**, [s.l.], v. 62, n. 1, p. 31–38, 2007.

ESPÍN-PAREDES, Elena *et al.* Factores de riesgo asociados a neuropatía diabética dolorosa. **Revista Mexicana de Anestesiología**, Ciudad de Mexico, v. 33, n. 2, p. 69–73, 2010.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Nat. Prod. Rep.**, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 145–161, 2007.

FERREIRA, Rafael Carlos. **Avaliação comparativa entre dois modelos de indução química de diabetes mellitus tipo 1 em ratos Wistar**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2017.

FOX, Alyson *et al.* Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. **Pain**, [s.l.], v. 81, n. 3, p. 307-316, 1999.

GAGLIARDI, Antonio RT. Neuropatia diabética periférica. **Jornal vascular brasileiro**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 67-74, 2003.

GALER, Bradley S.; GIANAS, Ann; JENSEN, Mark P. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. **Diabetes research and clinical practice**, Clare, v. 47, n. 2, p. 123-128, 2000.

GEELLEN, C. C. et al. Anxiety affects disability and quality of life in patients with painful diabetic neuropathy. **European Journal of Pain**, Brussels, v. 21, n. 10, p. 1632-1641, 2017.

GIRACH, Ayesha et al. Quality of life in painful peripheral neuropathies: a systematic review. **Pain Research and Management**, [s.l.], v. 2019, 2019.

GODOY, Livia *et al.* Mygalin: A New Anticonvulsant Polyamine in Acute Seizure Model and Neuroethological Schedule. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 122-131, 2013.

GRIGSBY, Allison B. *et al.* Prevalence of anxiety in adults with diabetes a systematic review. **Journal of Psychosomatic Research**, [s.l.], v. 53, n. 6, p. 1053–1060, 2002.

GUIMARÃES, R. R. *et al.* Atualização em Neuropatias Periféricas relacionadas às alterações neurais e vasculares ocorrentes na Diabetes Mellitus em modelos animais. **Revista Brasileira de Neurologia**, [s.l.], v. 45, n. 2, p. 13-20, 2009.

HSIEH, Jen-Chuen *et al.* Traumatic nociceptive pain activates the hypothalamus and the periaqueductal gray: a positron emission tomography study. **Pain**, [s.l.], v. 64, n. 2, p. 303-314, 1996.

INTERNACIONAL DIABETES FOUNDATION. IDF. **Diabetes Atlas Ninth Edition**. Brussels, Belgium: 2019. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>

JAIN, Rakesh *et al.* Painful diabetic neuropathy is more than pain alone: Examining the role of anxiety and depression as mediators and complicators. **Current Diabetes Reports**, Nueva York, v. 11, n. 4, p. 275–284, 2011.

JULIUS, D.; BASBAUM, A I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, [s.l.], v. 413, n. 6852, p. 203–10, set. 2001.

KING, G. F.; VETTER, I. No gain, no pain: Nav1.7 as an analgesic target. **ACS Chemical Neuroscience**, Washington, v. 5, n. 9, p. 749–751, 2014.

KHUWAJA, Ali Khan et al. Anxiety and depression among outpatients with type 2 diabetes: A multi-centre study of prevalence and associated factors. **Diabetology & metabolic syndrome**, California, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2010.

LENG, Y. F. *et al.* Effects of tetramethylpyrazine on neuronal apoptosis in the superficial dorsal horn in a rat model of neuropathic pain. **Am J Chin Med**, [s.l.], v. 40, n. 6, p. 1229–1239, 2012.

LERCO, Mauro Masson *et al.* Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.18, n.2, p. 132-142, 2003.

LI, C. *et al.* Diabetes and anxiety in US adults: Findings from the 2006 behavioral risk factor surveillance system. **Diabetic Medicine**, [s.l.], v. 25, n. 7, p. 878–881, 2008.

MANN, J. J. *et al.* Neurobiology of Severe Mood and Anxiety Disorders. [s.l: s.n.], 2012.

MCGARAUGHTY S, Farr DA, Heinricher MM. Lesions of the periaqueductal gray disrupt input to the rostral ventromedial medulla following microinjections of morphine into the medial or basolateral nuclei of the amygdala. **Brain Res**. [s.l.], v. 1009, n. 1-2, p. 223-227, 2004.

METZ, A. E. *et al.* Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2423–2428, 2009.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, [s.l.], v. 66, n. 6, p. 355–474, 2002.

MINISTERIO DA SAUDE. **Diabetes Mellitus: Cuadernos de atencão basica**. N. 16, serie A. Normas manuais tecnicos. Brasilia-DF, 2006.

MOINI, Jahangir. **Epidemiology of diabetes**. 1ft edition. United Kingdom: Elsevier, 2019.

MORA, Ángela C. *et al.* Oxidative Stress Characterization in Streptozotocin-diabetic Wistar rats. **Vitae**, Medellín, v. 16, n. 3, p. 311-319, 2009.

MORGADO, Carla; TERRA, Patrícia Pereira; TAVARES, Isaura. Neuronal hyperactivity at the spinal cord and periaqueductal grey during painful diabetic neuropathy: effects of gabapentin. **European journal of pain**, [s.l.], v. 14, n. 7, p. 693-699, 2010.

NARANJO, Cristina et al. Anxiety, depression and sleep disorders in patients with diabetic neuropathic pain: a systematic review. **Expert review of neurotherapeutics**, [s.l.], v. 19, n. 12, p. 1201-1209, 2019.

ONSTOTT, Donna; MAYER, Bernd; BEITZ, Alvin J. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. **Brain research**, [s.l.], v. 610, n. 2, p. 317-324, 1993.

OSSIPOV, Michael H. et al. Central modulation of pain. **The Journal of clinical investigation**, [s.l.], v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 2010.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Informe mundial sobre la Diabetes. [s.l.], 2016.

PALIZGIR, Maryam; BAKHTIARI, Maryam; ESTEGHAMATI, Alireza. Association of depression and anxiety with diabetes mellitus type 2 concerning some sociological factors. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. 644–648, 2013.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier, 1986.

PEREIRA, L. S. et al. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 352, n. 4, p. 953–959, 2007.

PÉREZ MOLINA, I. AYUGA, Loro F. **Dolor neuropático**. Toledo: SESCAM. Área de Farmacia, 2000.

PINHEIRO, Ricardo Cardoso *et al.* Prevalência de sintomas depressivos e ansiosos em pacientes com dor crônica. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 3, p. 213–219, 2014.

PURVES, D. *et al.* **Neurociências**. [s.l: s.n.], 2010.

RAJA, Srinivasa N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [s.l.], v. 161, n. 9, p. 1976-1982, 2020.

RAUPP, Isabela Terra *et al.* Diabetes Mellitus Tipo 2 e saúde mental: uma abordagem multidisciplinar/ Type 2 diabetes Mellitus and mental health: a multidisciplinary approach. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 90–104, 2021.

ROCHA, Igor Rafael Correia. **Efeito da fotobioestimulação na neuropatia periférica de ratos com diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina**. 2017. 60f. Dissertação (Mestrado em ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2017

RODRIGUES, Paulla Vieira. **Comparação entre estreptozotocina e aloxana como indutores de diabetes experimental para estudos dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética**. 2018. 78f. Dissertação (Mestrado em Biología Celular e Estructural aplicadas). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlandia, MG, 2018.

- ROIZEN MF, Newfield P, Eger EI, Hosobuchi Y, Adams JE, Lamb S. Reduced anesthetic requirement after electrical stimulation of periaqueductal gray matter. **Anesthesiology**, [s.l.], v. 62, n. 2, p. 120-3, 1985.
- SAEZ, N. J. et al. Spider-Venom Peptides as Therapeutics. **Toxins**, [s.l.], v. 2, n. 12, p. 2851–2871, 20 dez. 2010.
- SAMPER-BERNAL, D. *et al.* Etiología y manejo de la neuropatía diabética dolorosa. **Revista de la Sociedad Española del dolor**, Barcelona, v. 17, n. 6, p. 286-296, 2010.
- SANDKÜHLER, J. Understanding LTP in pain pathways. **Molecular pain**, [s.l.], v. 3, p. 9, 3 abr. 2007.
- SCHREIBER, Anne K. *et al.* Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment. **World journal of diabetes**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 432, 2015.
- SEGERDAHL, Andrew R. *et al.* A brain-based pain facilitation mechanism contributes to painful diabetic polyneuropathy. **Brain**, Oxford, v. 141, n. 2, p. 357-364, 2018.
- SIEBERG, Christine B. *et al.* Neuropathic pain drives anxiety behavior in mice, results consistent with anxiety levels in diabetic neuropathy patients. **Pain Reports**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 1–11, 2018.
- SIEGFRIED, Bert; DE SOUZA, Ricardo L. Nunes. NMDA receptor blockade in the periaqueductal grey prevents stress-induced analgesia in attacked mice. **European journal of pharmacology**, [s.l.], v. 168, n. 2, p. 239-242, 1989.
- SILVA, Márcia Ferreira da *et al.* Swimming training attenuates contractile dysfunction in diabetic rat cardiomyocytes. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, Viçosa, v. 97, n. 1, p. 33-39, 2011.
- SMITH, K. J. e DESCHÊNES, S. S. e SCHMITZ, N. Investigating the longitudinal association between diabetes and anxiety: a systematic review and meta-analysis. **Diabetic Medicine**, [s.l.], v. 35, n. 6, p. 677–693, 2018.
- SMITH, Kimberley J. *et al.* Association of diabetes with anxiety: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Psychosomatic Research**, [s.l.], v. 74, n. 2, p. 89–99, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychores.2012.11.013>>.
- SOCIEDAD BRASILEIRA DA DIABETES (SBD). DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2019-2020. Brasil: Clannad, editora científica, 2020.
- SOUSA, Angela Maria et al. Experimental models for the study of neuropathic pain. **Revista Dor**, São Paulo, v. 17, p. 27-30, 2016.
- SOUSA, S. R. et al. Discovery and mode of action of a novel analgesic β -toxin from the African spider *Ceratogyrus darlingi*. **PLoS ONE**, California, v. 12, n. 9, p. 1–22, 2017.

SOUZA, Layz Alves Ferreira *et al.* Epidemiologia e qualidade de vida em indivíduos com neuropatia diabética dolorosa: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, Goiânia, v. 12, n. 4, p. 746–52, 2010.

STAMFORD, J. A. Descending control of pain. **British journal of anaesthesia**, [s.l.], v. 75, n. 2, p. 217-227, 1995.

STRØMGAARD, K.; MELLOR, I. AMPA receptor ligands: Synthetic and pharmacological studies of polyamines and polyamine toxins. **Medicinal Research Reviews**, [s.l.], v. 24, n. 5, p. 589–620, 2004.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**, Prague, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

SZKUDELSKI, Tomasz. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. **Experimental biology and medicine**, [s.l.], v. 237, n. 5, p. 481-490, 2012.

TACUAMAN, Sonia. Actividad hipoglucemiante del extracto Hidroalcoholico de Jungia rugosa en ratones (*Mus musculus*) diabéticos inducidos por estreptozotocina. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bioquímica e Farmaceutica). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Rio bamba, 2015.

TORRANCE, Nicola *et al.* Neuropathic pain in the community: more under-treated than refractory?. **PAIN@**, [s.l.], v. 154, n. 5, p. 690-699, 2013.

UEHARA BENITES, M. *et al.* POLINEUROPATIA. [s.l: s.n. s.d.].

VARTIAINEN, P. et al. Validation of EQ-5D and 15D in the assessment of health-related quality of life in chronic pain. **Pain**, [s.l.], v. 158, n. 8, p. 1577–1585, 2017.

VIEIRA, Eveline Bis; PANISSI, Christie Ramos Andrade Leite. **Análise funcional da substância cinzentada periaquedutal no comportamento de imobilidade tônica em cobaias (*cavia porcellus*)**. 2007. Dissertação (Mestre em Ciências. Área: Psicobiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2007.

VIERA, T. M. **Descrição do método de indução de diabetes mellitus para testes de novas drogas e procedimentos específicos**. 2010. 43f. Tese (Doutorando em: Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba). Universidade Estadual Paulista, São paulo, SP, 2010.

WALKER, A. K. *et al.* Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. **Pharmacological reviews**, Cambridge, v. 66, n. 1, p. 80–101, 2014.

WALKER, D. *et al.* Structural abnormalities do not explain the early functional abnormalities in the peripheral nerves of the streptozotocin diabetic rat. **J Anat**, [s.l.], v. 195, n. 3, p. 419-427, 1999.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A. The open field test: a critical review. **Pshycological bulletin**, Stamford, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.

WILSON, G. L. *et al.* Mechanisms of streptozotocin-and alloxan-induced damage in rat B cells. **Diabetologia**, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 587-591, 1984.

XIONG, X. F. *et al.* Structure-activity relationship study of spider polyamine toxins as inhibitors of ionotropic glutamate receptors. **ChemMedChem**, [s.l.], v. 9, n. 12, p. 2661–2670, 2014.

YAMAMOTO, H. *et al.* Specific Roles of NMDA Receptor Subunits in Mental Disorders. **Current molecular medicine**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 193–205, 2015.

YAN, Ni. *et al.* Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex mediates the affective component of visceral pain memory in rats. **Neurobiology of learning and memory**, v. 97, n. 1, p. 156-164, 2012.

ZAMBANINI, Andrew *et al.* Injection related anxiety in insulin-treated diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s.l.], v. 46, n. 3, p. 239–246, 1999.