

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GERALDO DA SILVA XAVIER NETO

**INVESTIGAÇÃO DAS IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA VIA
DAS QUINURENINAS NA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA**

Alfenas/MG

2021

GERALDO DA SILVA XAVIER NETO

INVESTIGAÇÃO DAS IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA VIA
DAS QUINURENINAS NA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre/Doutor em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rabelo de Souza.

Alfenas/MG

2021

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

X3i Xavier Neto, Geraldo da Silva
Investigação das implicações fisiopatológicas da via das quinureninas na dor neuropática diabética . / Geraldo da Silva Xavier Neto. – Alfenas, MG, 2021.
64 f.: il. –

Orientador: Guilherme Rabelo de Souza.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Diabetes. 2. Dor Neuropática Diabética. 3. Neuropatia. 4. Indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO). 5. Depressão. I. Souza, Guilherme Rabelo de. II. Título.

CDD- 616

Geraldo da Silva Xavier Neto

INVESTIGAÇÃO DAS IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA VIA DAS QUINURENINAS NA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

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: 08 de junho de 2021.

Prof. Dr. Guilherme Rabelo de Souza
Instituição: Faculdade Cidade de Patos de Minas
FMP

Prof. Dr. Flávio Protásio Veras
Instituição: Universidade de São Paulo
(FMRP-USP)

Prof. Dr. Douglas da Silva Prado
Instituição: University of Pittsburgh



Documento assinado eletronicamente por Douglas da Silva Prado, Usuário Externo, em 08/06/2021, às 18:34, 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 Flávio Protásio Veras, Usuário Externo, em 08/06/2021, às 18:37, 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 Guilherme Rabelo de Souza, Usuário Externo, em 08/06/2021, às 18:56, 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 0526165 e o código CRC BA9DD234.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

Nossos agradecimentos.

RESUMO

A prevalência global de diabetes atingiu 9,3% da população mundial, sendo o diabetes tipo 2 responsável por cerca de 90% de todos os casos. Dentre as possíveis complicações decorrentes do diabetes, podemos evidenciar a neuropatia diabética. Nas últimas décadas, a ativação da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO-1) tem sido relatada, promovendo a formação de metabólitos ativos conhecidos como quinureninas. Estes metabólitos bioativos ativam receptores específicos que corroboram a dor inflamatória e neuropática. Também é conhecido que essa via metabólica reduz substancialmente os níveis do neurotransmissor serotonina (5HT) podendo favorecer sintomas de dor e também depressão. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação da enzima IDO-1 na indução e manutenção da dor neuropática induzida pelo diabetes em animais de experimentação e sua relação com a depressão em humanos. O diabetes experimental foi induzido pela administração intraperitoneal de aloxana (150mg/kg). A alodinia foi avaliada utilizando os filamentos de von Frey, antes e após a inibição farmacológica da enzima IDO-1 em ratos diabéticos. Buscando encontrar comorbidades no diabetes, pacientes provenientes do Programa de Saúde da Família do Município de Patos de Minas – MG foram selecionados. Sangue periférico foi coletado para dosagem de glicohemoglobina em sangue total e serotonina no soro. Também foram quantificados os níveis do metabólito da serotonina o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) na urina dos pacientes. Nossos resultados em animais demonstraram que ratos diabéticos tratados com inibidor da enzima IDO-1 apresentaram redução da alodinia. Já os resultados obtidos em pacientes diabéticos demonstram menores níveis plasmáticos de serotonina e maiores níveis de 5-HIAA. Ainda, avaliamos os prontuários dos pacientes diabéticos neuropáticos e constatamos que alguns pacientes também tinham a comorbidade depressiva. Dessa forma, sugerimos o envolvimento da enzima IDO-1 na dor neuropática induzida por diabetes e uma possível comorbidade depressiva nos pacientes avaliados.

Palavras-chave: Diabetes; Dor Neuropática Diabética; Neuropatia; Indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO); Depressão.

ABSTRACT

The global prevalence of diabetes reached 9.3% of the world population, with type 2 diabetes being responsible for about 90% of all cases. Among the possible complications arising from diabetes, we can highlight diabetic neuropathy. In recent decades, activation of the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO-1) has been reported, promoting the formation of active metabolites known as kynurenines. These bioactive metabolites activate specific receptors that support inflammatory and neuropathic pain. It is also known that this metabolic pathway substantially reduces the levels of the neurotransmitter serotonin (5HT), corroborating to the pain and depression. Therefore, the aim of this work was investigate the participation of the IDO-1 enzyme in the induction and maintenance of neuropathic pain induced by diabetes in rats and its relationship with depression in humans. Experimental diabetes was induced by intraperitoneal administration of alloxan (150mg/kg). Allodynia was evaluated using von Frey filaments before and after pharmacological inhibition of the IDO-1 enzyme in diabetic rats. Looking to find comorbidities in diabetes, patients from the Family Health Program of the city of Patos de Minas - MG were selected. Peripheral blood was collected to measure glycohemoglobin and serotonin in serum. The levels of the serotonin metabolite 5-HIAA in the patients' urine were also quantified. Our results in animals demonstrated that diabetic rats treated with IDO-1 enzyme inhibitor showed reduced allodynia. The results obtained in diabetic patients demonstrate lower plasma levels of serotonin and higher levels of 5-HIAA. Furthermore, we evaluated the medical records of neuropathic diabetic patients and found that some patients also had depressive comorbidity. Thus, we can suggest the involvement of the IDO-1 enzyme in diabetes-induced neuropathic pain and a possible depressive comorbidity in these evaluated patients.

Keywords: Diabetes; Diabetic Neuropathic Pain; Neuropathy; Indoleamine - 2,3 - Dioxygenase (IDO-1); Depression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Prevalência do Diabetes a nível mundial	10
Figura 2 -	Vias de metabolização do triptofano	20
Figura 3 -	Representação do cronograma experimental	24
Figura 4 -	Representação do cronograma experimental	27
Figura 5 -	Avaliação do limiar de dor em animais naive	33
Figura 6 -	Aloxana administrada por via intraperitoneal induz alodinia em ratos..	34
Figura 7 -	Efeito do norharmane na alodinia – 1o dia de tratamento.....	35
Figura 8 -	Efeito do norharmane na alodinia– 2o dia de tratamento.....	36
Figura 9 -	Efeito do norharmane na alodinia – 3o dia de tratamento.....	36
Figura 10-	Efeito do norharmane na alodinia – 3o dia de tratamentofeito do norharmane na alodinia – 4º dia de tratamento	37
Figura 11 -	Avaliação da alodinia após o fim do tratamento farmacológico	38
Figura 12 -	Efeito do norharmane na alodinia – tratamento farmacológico por 4 dias consecutivos	40
Figura 13 -	Efeito norharmane no teste de campo aberto	41
Figura 14 -	Perfil glicêmico de pacientes diabéticos e não diabéticos.....	42
Figura 15 -	Dosagem de HBA1C de pacientes diabéticos e não diabéticos	42
Figura 16 -	Dosagem de serotonina em pacientes diabéticos e não diabéticos.....	43
Figura 17 -	Dosagem de 5-HIAA em pacientes diabéticos e não diabéticos	44
Figura 18 -	Dosagem de serotonina em pacientes diabéticos e diabéticos neuropatas	45
Figura 19 -	Dosagem de serotonina em pacientes diabéticos diagnosticados com neuropatia e depressão e pacientes não diabéticos	46
Figura 20 -	Dosagem de 5-HIAA em pacientes diabéticos diagnosticados com dor neuropática e não diabéticos	47
Figura 21 -	Dosagem de 5-HIAA em pacientes diabéticos diagnosticados com dor neuropática e depressão.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	monofosfato cíclico de adenosina
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP – FPM	Comitê de ética em pesquisa da Faculdade Patos de Minas
CEUA	comissão de ética no uso de animais
CGRP	gene da calcitonina
COVID -19	Corona Virus Disease
DM	Diabetes mellitus
EPM	erro padrão da média
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
IASP	International Association for the Study of Pain
IDO	enzima indoleamina 2,3 dioxigenase
NGF	fator de crescimento nervoso
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NPD	Neuropatia Periférica Diabética
PAG	substância cinzenta periaquedutal
RVM	medula ventromedial rostral
SP	substância P
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- α	fator de necrose tumoral
TOTG	teste oral de tolerância à glicose
5-HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	FISIOPATOLOGIA DA DOR	13
3.2	DOR NEUROPÁTICA	16
3.3	IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DO DIABETES <i>MELLITUS</i> NA DOR NEUROPÁTICA	16
3.4	VIA DAS QUINURENINAS	18
3.5	COMORBIDADE ENTRE NEUROPATIA DIABÉTICA E DEPRESSÃO	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	22
4.1.1	Animais	22
4.1.2	Grupos experimentais animais	22
4.1.3	Delineamento Experimental	23
4.1.4	Indução do diabetes <i>Mellitus</i> em ratos	24
4.1.5	Caracterização da diabetes mellitus	25
4.1.6	Estudo da participação da via das quinureninas	25
4.1.7	Avaliação do limiar de dor	25
4.1.8	Avaliação do deslocamento exploratório em campo aberto	26
4.2	PESQUISA CLÍNICA EM PACIENTES DIABÉTICOS	27
4.2.1	Seleção da amostra e aspectos éticos	27
4.2.2	Critérios de inclusão e exclusão	28
4.2.3	Coleta das amostras	29
4.2.4	Dosagem de HBA1c (Glicohemoglobina e glicose média estimada)	30
4.2.5	Dosagem de serotonina total	30
4.2.6	Dosagem de metabólito de serotonina (5HIAA)	31
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS	33
5.1	AVALIAÇÃO DO LIMIAR DE DOR (ALODINIA) ANTES DA INDUÇÃO DO	

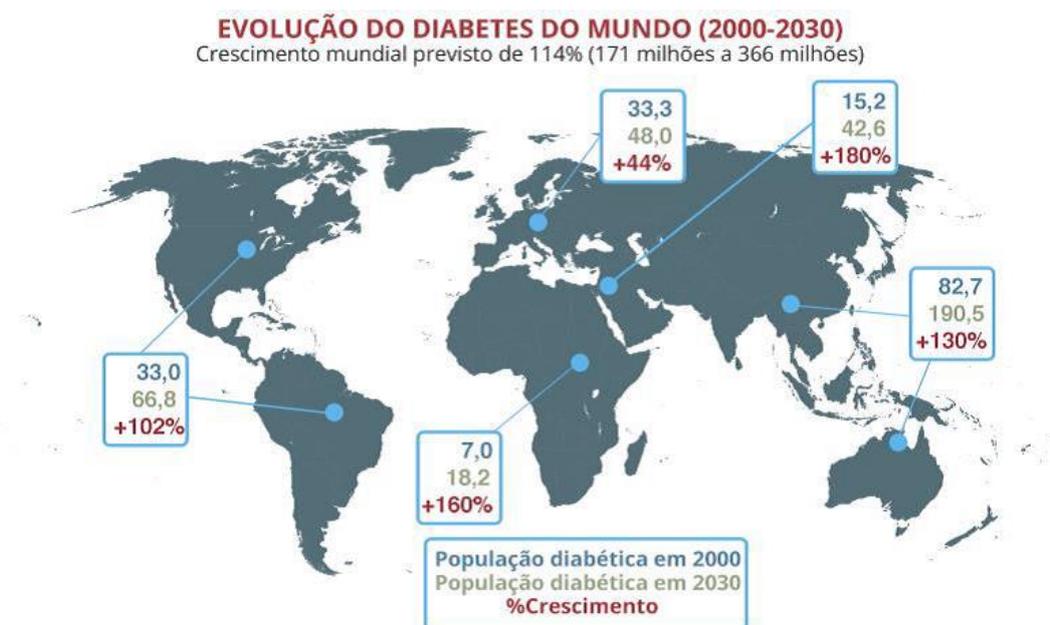
	DIABETES.....	33
5.2	DIABETS EXPERIMENTAL INDUZ NOCICEPÇÃO MECÂNICA EM RATOS	33
5.3	PAPEL DA ENZIMA IDO-1 NA REDUÇÃO DA ALODINIA.....	34
5.4	AVALIAÇÃO DA ALODINIA – 5º DIA DE EXPERIMENTAÇÃO	37
5.5	AVALIAÇÃO TEMPORAL DA ALODINIA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE NORHARMANE.....	38
6.6	AVALIAÇÃO DO DESLOCAMENTO EXPLORATÓRIO DOS ANIMAIS NO TESTE DE CAMPO ABERTO (<i>OPEN FIELD</i>).....	40
5.7	RASTREIO E CARACTERIZAÇÃO DO DIABETES ATRAVÉS DA GLICOHEMOGLOBINA EM HUMANOS.....	41
5.8	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SEROTONINA TOTAL (5HT) EM SORO DO PACIENTES DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS.....	43
5.9	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÁCIDO 5-HIDROXIINDOLACÉTICO (5-HIAA) EM PACIENTES DIABÉTICOS	43
5.10	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SEROTONINA EM PACIENTES DIABÉTICOS ASSOCIADOS COM NEUROPATIA.....	44
5.11	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SEROTONINA EM PACIENTES DIABÉTICOS E DIABÉTICOS DIAGNÓSTICOS COM NEUROPATIA E DEPRESSÃO	45
5.12	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 5-HIAA EM URINA DE PACIENTES DIABÉTICOS E DIABÉTICOS DIAGNOSTICADOS COM NEUROPATIA.....	46
5.13	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 5-HIAA NA URINA DE PACIENTES DIABÉTICOS E DIABÉTICOS DIAGNOSTICADOS COM DOR NEUROPÁTICA E DEPRESSÃO	47
6	DISCUSSÃO	49
6.1	LIMITAÇÕES	55
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO – APROVAÇÃO CEUA.....	65

1 INTRODUÇÃO

A prevalência de diabetes *mellitus* (DM) atingiu 9,3% no mundo, sendo o diabetes tipo 2 responsável por cerca de 90% de todos os casos. A previsão para o ano de 2045 é assustadora, podendo chegar até 700 milhões de casos. O diabetes foi responsável por cerca de US\$ 760 bilhões em gastos com saúde em 2019 e as complicações do diabetes estão entre as 10 principais causas de morte, com quase metade ocorrendo em pessoas com menos de 60 anos. (IDF DIABETES ATLAS, 2019).

O DM consiste em um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de uma deficiência na produção de insulina ou na sua ação. A hiperglicemia se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que promovem riscos de vida, como a cetoacidose diabética e síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica. A hiperglicemia crônica está associada ao dano, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, neurônios, coração e vasos sanguíneos. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Figura 1 - Prevalência do Diabetes a nível mundial



Fonte: Adaptado de International Diabetes Federation (2019)

Dentre as complicações do diabetes, dano ao sistema nervoso periférico e autônomo (CALLAGHAN *et al.*, 2015), causam perda da função sensorial e também quadros dolorosos afetando diretamente a qualidade de vida dos pacientes (POP-BUSUI *et al.*, 2017). Estas complicações são denominadas de neuropatia e ocorrem em cerca de 50% dos pacientes diabéticos (FRANKLIN *et al.*, 1990; DYCK *et al.*, 1993). A neuropatia diabética afeta principalmente neurônios periféricos, entretanto pode também comprometer o sistema nervoso central. No início da doença, os pacientes podem apresentar sintomas positivos como dor e formigamento nos membros inferiores ou sintomas negativos como parestesia, alodinia (dor quando os pés são tocados) ou hiperalgesia (aumento da sensibilidade à estímulos nocivos). Com o passar do tempo aparecem sintomas motores, como fraqueza nos dedos, pés, tornozelos e panturrilhas (FELDMAN *et al.*, 2017) sendo responsáveis pela perda do equilíbrio e quedas, afetando drasticamente a qualidade de vida dos pacientes (POP-BUSUI *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, evidências sugerem que o sistema imune pode favorecer mecanismos para o desenvolvimento da dor neuropática (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010). Um dos fatores que corroboram a interação neuro-imune é a ativação da via das quinureninas, sugerindo dessa forma que esta via metabólica pode contribuir para a manutenção da dor neuropática (GUNN *et al.*, 2020).

Dados da literatura sugerem que a ativação da via das quinureninas resulta em neuro-inflamação podendo promover neurotoxicidade contribuindo dessa forma para a patogênese da dor e também outras comorbidades, dentre elas a depressão. (KIM *et al.*, 2012; WALKER *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2015; ROJEWSKA *et al.*, 2016; LAUMET *et al.*, 2017). Corroborando, têm sido verificado que as comorbidades neuropatia diabética e depressão, ocorrem com aproximadamente 30% dos pacientes diabéticos (GUSTORFF *et al.*, 2007; MESCI N.; MESCI E.; KÜLCÜ, 2016).

Devido à alta prevalência da dor neuropática diabética e ainda, possibilidade de comorbidades as quais prejudicam a qualidade de vida dos pacientes, se faz necessário investigar novos mecanismos fisiopatológicos para favorecer a descoberta de novos alvos farmacológicos.

O diagnóstico precoce do diabetes é de extrema importância pois, possibilita normalização da glicemia evitando assim a progressão do diabetes e por consequência outras complicações, dentre elas a dor neuropática diabética e depressão, visto que essas comorbidades reduzem consideravelmente a qualidade

de vida dos pacientes.

Por outro lado, os pacientes já diagnosticados com diabetes e que apresentam dor neuropática necessitam de tratamentos farmacológicos, entretanto esses medicamentos não reduzem totalmente os sintomas dolorosos. Dessa forma, novos alvos farmacológicos são desejados para proporcionar melhor qualidade de vida para os pacientes diabéticos neuropáticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi investigar a participação da enzima IDO-1 na dor induzida pelo diabetes experimental e mensurar os níveis de serotonina e seu metabólito 5-HIAA em pacientes diabéticos diagnosticados com neuropática e ou associados com a comorbidade depressão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente estudo foi dividido em duas partes. Na primeira etapa os experimentos foram realizados em animais de experimentação (a e b). Na segunda etapa os experimentos foram realizados em seres humanos (c,d,e).

- a) Avaliar a alodinia em animais diabéticos e não diabéticos utilizando filamentos de von Frey antes e após o tratamento farmacológico com o inibidor da enzima IDO1 (Norharmane[®]);
- b) Avaliar a atividade locomotora de animais diabéticos e não diabéticos através do teste de campo aberto antes e após o tratamento farmacológico utilizando inibidor da enzima IDO-1 (Norharmane[®]);
- c) Caracterizar o diabetes em humanos através da dosagem de glicohemoglobina e glicose média estimada em amostras de sangue total de pacientes selecionados para o estudo.
- d) Quantificar os níveis de serotonina total no soro dos pacientes diabéticos.
- e) Quantificar os níveis do metabólito 5-HIAA na urina de pacientes diabéticos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FISIOPATOLOGIA DA DOR

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*), a dor é uma experiência sensitiva e

emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial dos tecidos (TREEDE, 2018). A dor tem papel fisiológico e funciona como um sinal de alerta para percepção de algo que está ameaçando a integridade física do organismo (CHAPMAN; GAVRIN, 1999). É uma sensação subjetiva e complexa, modificada pelas vivências anteriores, pela memória, pelas expectativas e emoções de cada um, associada ao sofrimento ou ao desconforto (BOGDUK, 2018; MERSKEY, 2008;).

A dor é uma experiência complexa e que não envolve apenas a transdução de estímulo nocivo ambiental, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; JULIUS; BASBAUM, 2001;). Estudos recentes relatam a necessidade de considerar a dor como uma perspectiva biopsicossocial para a sua avaliação e tratamento (ARAÚJO *et al.*, 2011).

A percepção da dor se apresenta em dois momentos distintos. O primeiro, denominado nocicepção, refere-se à transdução do estímulo doloroso ao sistema nervoso central (SNC) por receptores específicos, os nociceptores. O segundo estágio é referente ao processamento elaborado dessa informação nociceptiva, levando à percepção consciente da dor (BALDO, 1999).

A nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”), ou sensação nociceptiva, resulta da detecção seletiva de estímulos capazes de comprometer a integridade física de um organismo. A percepção é uma função integrativa modulada por condições emocionais, motivacionais e psicológicas, bem como experiências de vida de cada pessoa (PINTO; CARVALHO; SÁ, 2014).

A primeira etapa da sequência de eventos que origina o fenômeno sensitivo-doloroso é a transformação dos estímulos ambientais físicos ou químicos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas são transferidos para o SNC (TEIXEIRA, 2001).

Os receptores específicos para são as fibras nervosas A δ e C. (LEVINE; TAIWO,1994; LOEWENSTEIN,1971). Terminações estas que quando ativadas deflagram potenciais de ação promovendo alterações no potencial elétrico das membranas traduzindo um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o SNC e interpretado no córtex somatossensorial como dor (ROCHA *et al.*, 2007).

As fibras A δ são finamente mielinizadas e as fibras C desprovidas de mielina possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades. As fibras A δ , em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo

doloroso de forma rápida, enquanto as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor (ROCHA *et al.*, 2007).

A sensibilização dos nociceptores ocorre pela ação de substâncias químicas, denominadas algogênicas, presentes no ambiente tissular, são elas: acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrieno, substância P, fator de ativação plaquetário potássio, prostaglandinas, tromboxana, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento nervoso (NGF) e monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (WEBSTER, 1977; RAJASEKARAN; KANNA; SHETTY, 2015).

Quanto à neuroquímica, as fibras nervosas são divididas em três grupos: tipo C peptidérgicos, tipo C não peptidérgicos e tipo A δ . Todas elas utilizam o glutamato como neurotransmissor excitatório no sistema nervoso. Porém, um grupo de nociceptores C peptidérgicos liberam também neuropeptídeos, como a substância P (SP) ou o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), e dependem do fator de crescimento neuronal (NGF) para o seu desenvolvimento e sobrevivência (BELMONTE; CERVERO, 1996).

As fibras C não peptidérgicos não produzem peptídeos, dependem do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e podem ser identificados pela presença de isolectinas específicas, receptores purinérgicos ou enzimas específicas. As fibras A δ dependem da neurotrofina e em parte do BDNF, e são identificados facilmente pela presença de neurofilamentos específicos. Os neurônios sensitivos podem também sintetizar outras moléculas que contribuem para a transmissão ou modulação da informação nociceptiva para os neurônios do corno dorsal da medula espinhal, tais como prostaglandinas, ATP e óxido nítrico (NO) (XU; WIESENFELD-HALLIN, 1997). Essas moléculas podem contribuir não somente para a dor aguda, podendo também ser importante para a manutenção da dor, sendo melhor denominada de dor crônica.

Embora os mecanismos envolvidos na patogênese da dor neuropática não sejam totalmente compreendidos, há evidências na literatura de que o desequilíbrio no controle descendente da dor possa contribuir para a gênese e/ou manutenção desta patologia.

A substância cinzenta periaquedutal (PAG), o núcleo magno da rafe e as estruturas adjacentes do bulbo, como a medula ventromedial rostral (RVM) e com suas projeções ao corno dorsal da medula espinhal, constituem parte do sistema de controle descendente da dor (VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). Sob circunstâncias normais, a via descendente fornece um controle negativo de sinais nociceptivos em

nível da medula espinal, atenuando os sinais subsequentes e impedindo a dor excessiva (FIELDS, 1988). Os principais neurotransmissores envolvidos na modulação de mecanismos endógenos da dor através das vias inibitórias descendentes são a serotonina e a noradrenalina (FIELDS; BASBAUM, 1999).

3.2 DOR NEUROPÁTICA

A dor neuropática é definida pela IASP como “dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso”. Portanto, a dor neuropática periférica ocorre quando uma lesão ou disfunção afeta o sistema nervoso periférico (RYABOV; SEROV, 2014). Esta dor manifesta-se como uma gama de sintomas diferentes, incluindo dor em queimação contínua, dor semelhante a compressão ou pressão, sensações paroxísticas semelhantes a choque elétrico ou dor aguda e alodinia dinâmica (TRUINI; GARCIA-LARREA; CRUCCU, 2013).

Diversos estudos ao redor do mundo demonstram que cerca de 7-8% dos adultos apresentam dor com características neuropáticas. A dor neuropática periférica pode ser causada por lesão nervosa ou em consequência a outras doenças. Causas importantes incluem radiculopatia lombar (dor ciática), neuralgia pós-herpética (dor persistente após um episódio de herpes), neuropatia diabética, neuropatia causada por HIV e dor crônica pós-cirúrgica (INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN, 2015).

Na dor neuropática, o sistema nervoso é lesionado e alterações de plasticidade neuronal ocorrem contribuindo para o aumento da sensibilidade neuronal com grande potencial para se tornar crônica. A dor pode ocorrer espontaneamente e seu limiar pode cair drasticamente de forma que estímulos inócuos produzem dor de duração e amplitudes variadas. (KEHLET; JENSEN; WOOLF, 2006). A dor neuropática pode ser acompanhada por uma resposta excessiva a estímulos dolorosos (hiperalgesia) e por dor causada a estímulos não dolorosos, como o contato com meias, sapatos e roupas de cama (alodinia).

3.3 IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DO DIABETES *MELLITUS* NA DOR NEUROPÁTICA

Dor neuropática periférica induzida pelo diabetes é definida como “dor que surge como consequência direta de anormalidades no sistema somatossensorial periférico em pessoas com diabetes” (TESFAYE *et al.*, 2010).

A Neuropatia Periférica Diabética (NPD) ocorre em 30 a 50% dos pacientes com a doença (GORDOIS *et al.*, 2003). As complicações clínicas da neuropatia diabética incluem lentidão da condução das fibras nervosas, perda progressiva da sensação térmica e depleção de fibras epidérmicas (JOLIVALT *et al.*, 2016).

A NPD certamente reduz a qualidade de vida do paciente, interferindo no humor e a qualidade do sono de aproximadamente 10% a 20% dos pacientes com diabetes *mellitus* (LINDSAY *et al.*, 2010).

A NPD pode induzir distúrbios nervosos que podem ser classificados como periféricos, autonômicos, proximais e focais. A neuropatia autonômica pode levar a problemas relacionados ao sistema nervoso autônomo. A neuropatia focal pode afetar as mãos, a cabeça, o tronco e as pernas. A neuropatia proximal é um tipo raro e incapacitante de lesão do nervo no quadril, na nádega ou na coxa, levando à quadros algícos intensos (ANG *et al.*, 2018). Entretanto a mais prevalente é a neuropatia periférica afetando pernas, pés e ocasionalmente mãos e braços (TESFAYE *et al.*, 2010).

A hiperglicemia é a causa primária da neuropatia diabética clínica e experimental e, mais recentemente foi reconhecido que a deficiência de insulina e de peptídeo C como fatores neurotróficos também pode ter importante papel na patogenia da neuropatia diabética (TOMLINSON; GARDINER, 2008; WAHREN; LARSSON, 2015; XU *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da neuropatia periférica diabética inicia-se pelas alterações bioquímicas que levam ao acúmulo de sorbitol e frutose nos nervos periféricos (GABBAY; MEROLA; FIED, 1966). A aldose redutase converte glicose em sorbitol, que subsequentemente é convertido em frutose pela poliol desidrogenase. O acúmulo de sorbitol e frutose determina diminuição dos níveis de mioinositol no nervo, levando à desmielinização axonal (YACYAHISHI *et al.*, 1993).

Os inositóides são parte importante da membrana celular e reguladores de seus canais iônicos dependentes de Ca^{++} . Menores níveis de inositóis determinam maior susceptibilidade da membrana à entrada e ao acúmulo intracelular de Na^{+} , resultando, portanto, em maior tendência à despolarização neuronal evoluindo para degeneração neuronal (KAI; HAWTHORNE, 1969).

Na prática clínica, o diagnóstico de neuropatia periférica dolorosa baseia-se na descrição da dor pelo paciente. Os sintomas são distais, simétricos, frequentemente associados a exacerbações noturnas, descritos como formigamento, dor profunda e aguda, semelhante à choque com ardência. Pode ocorrer hiperalgesia e, por vezes, alodinia ao exame clínico (APFEL *et al.*, 2001). A quantificação dessa dor pode ser feita por meio de escalas e questionários validados. Dentre eles, a Escala de Likert de 11 pontos, o Inventário de Sintomas de Dor Neuropática (*Neuropathic Pain Symptoms Inventory*), o Inventário de Dor Breve (*Brief Pain Inventory*), o Questionário de Dor Neuropática (*Neuropathic Pain Questionnaire*) e o Questionário de Dor McGill (*McGill Pain Questionnaire*) (CRUCCU *et al.*, 2010).

Não há descrito um tratamento farmacológico efetivo que reverta ou evite o desenvolvimento da NPD, sendo os tratamentos preventivos os mais utilizados na busca do alívio dos sintomas de dor. As medidas preventivas consistem no rigoroso controle da glicemia e nos cuidados gerais com os pés, uma vez que o envolvimento neuropático e vascular torna o paciente susceptível a infecções e a suas complicações (MCNEELY *et al.*, 1995). Os medicamentos utilizados para a redução dos sintomas são antidepressivos, anticonvulsivantes, antiarrítmicos, capsaicina tópica, ácido alfa-lipóico, fatores neurotróficos e inibidores da aldose redutase (CAPSAICIN STUDY GROUP, 1997; MCQUAY *et al.*, 1996; TESFAYE; SELVARAJAH, 2012;; TOMLINSON; FERNYHOUGH; DIEMEL, 1997).

Os mecanismos patogênicos subjacentes à dor neuropática diabética são incertos e as opções terapêuticas ainda são limitadas. Porém, para que sejam desenvolvidos tratamentos mais efetivos e com menos efeitos adversos, se faz necessário o conhecimento e a elucidação dos mecanismos envolvidos em sua patogênese, objetivando tratamentos farmacológicos mais efetivos e se possível, sem reações adversas.

3.4 VIA DAS QUINURENINAS

A via das quinureninas tem como etapa limitante a ativação da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) sendo esta responsável por metabolizar o aminoácido triptofano a formilquinurenina que, através de metabolizações subsequentes, dará origem a diversos metabólitos biologicamente ativos

denominados genericamente de quinureninas. (FALLARINO, *et al.*, 2015; CARLIN, *et al.*, 1989).

O 3-hidroxiquinurênico (3-HK) é formado a partir da quinurenina pela enzima quinurenina 3-monooxigenase (KMO) e está envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio/radical hidroxila. Além disso, sabe-se que ocorre o aumento da expressão da KMO em condições inflamatórias dessa forma, o bloqueio dessa enzima poderia ser grande importância, pois impede a formação de 3-HK e de ácido quinolínico, (CARLIN *et al.*, 1989).

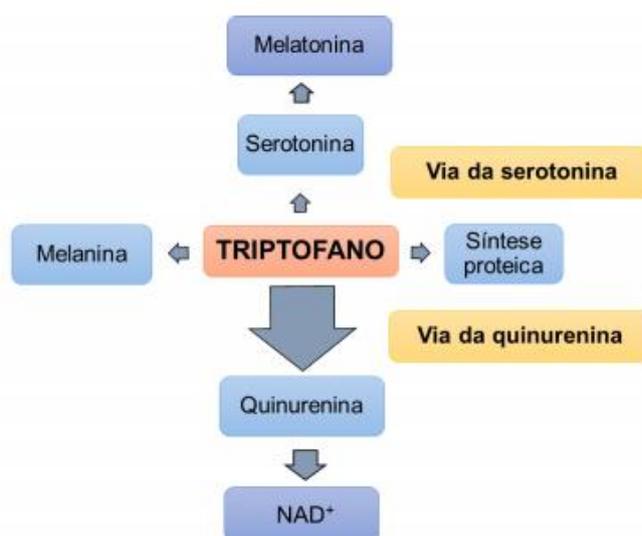
O ácido quinolínico é um agonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-methyl-D-aspartate), sendo este um dos produtos finais da via das quinureninas (STONE; PERKINS, 1981). Dessa forma, o ácido quinolínico, com seu efeito excitotóxico, ao ativar persistentemente os receptores NMDA, eleva os níveis intracelulares de cálcio, causando disfunção neuronal/morte celular e participando da sensibilização neuronal em regiões supraespinais.

Por outro lado, o ácido quinurênico é um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, AMPA e kainato e colinérgicos ($\alpha 7nAChR$) e teria, desse modo, um efeito protetor sob a excitotoxicidade promovida pela ativação dos receptores NMDA pelo ácido quinolínico. Além disso, foi descrito recentemente que o ácido quinurênico é um agonista do receptor GPR35, implicado na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatória (WANG *et al.*, 2006).

A enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) é constitutivamente expressa em diferentes células e tecidos como hepatócitos, células endoteliais, alguns subtipos de leucócitos e, principalmente, no pulmão e placenta (MEZRICH *et al.*, 2010).

Em situações normais, a expressão da IDO é relativamente baixa, no entanto, o aumento na expressão e atividade de IDO tem sido correlacionado a patologias como Alzheimer, depressão maior e dor inflamatória. Acredita-se que o aumento na expressão e atividade de IDO seja modulado por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ/α , TNF- α ou produtos bacterianos (ex. LPS), com a possível ativação de fatores de transcrição e vias de sinalização celular como NF κ B, STAT e MAPKs (CARLIN *et al.*, 1989; ROBINSON; SHIREY; CARLIN, 2003).

Figura 2 - Vias de metabolização do triptofano



Fonte: Carvalho *et al.* (2017)

3.5 COMORBIDADE ENTRE NEUROPATIA DIABÉTICA E DEPRESSÃO

O diagnóstico da depressão em pacientes com outras condições médicas é preocupante pois, normalmente prejudica as condições clínicas por diversos mecanismos. No paciente com diabetes a depressão compromete muito a qualidade de vida, incluindo saúde física, psicológica, relacionamentos sociais, dentre outros (EREN; ERDI; SAHIN, 2008), sendo que o diabetes foi associado a uma amplificação da sintomatologia (CIECHANOWSKI *et al.*, 2003).

Os primeiros estudos que verificaram maior prevalência de depressão no diabetes foram publicados há mais de 30 anos (ANDERSON *et al.*, 2001).

Estudos utilizando técnicas de neuroimagem têm investigado a possibilidade da depressão ser consequência de comprometimento cerebral nos pacientes diabéticos. De acordo com Kumar *et al.* (2008), pacientes com diabetes tipo 2 apresentaram menor volume de substância cinzenta na região frontal e no cíngulo anterior quando comparados aos pacientes controle. Outro possível mecanismo para explicar a associação entre depressão e diabetes é o aumento das catecolaminas.

As catecolaminas tem sido associadas a hiperglicemia por diminuir de síntese de insulina e ainda, pelo aumento de resistência periférica à ação da insulina (GOODNICK, 2001). Dessa forma, diabetes pode aumentar o risco de depressão,

influenciando negativamente no autocuidado e adesão ao tratamento (PETRAK et al., 2015), sugerindo dessa forma que a comorbidade entre a depressão e diabetes pode levar a consequências sérias, prejudicando dessa forma o controle do diabetes (PETRAK; RÖHRIG; ISMAIL, 2018). Desde então, trabalhos científicos vem relacionando mecanismos comuns entre as patologias, fato este que aumenta a probabilidade de comorbidade entre essas doenças.

Recentemente, foi verificado que pacientes com diabetes e depressão também podem apresentar outra comorbidade, a dor neuropática diabética. Os fatores que favorecem essas comorbidades são: idade avançada, estresse crônico, falta de atividade física e obesidade dentre outros (TABAK *et al.*, 2014).

Há também relatos na literatura que apontam a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), sistema imune e inflamação corroborando a etiologia do diabetes tipo 2, depressão e dor neuropática diabética (JOSEPH; GOLDEN, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

4.1.1 Animais

Os animais utilizados no presente trabalho foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar machos de 6 a 8 semanas de vida pesando entre 200 e 250 gramas. Os animais passaram por um período de ambientação por sete dias onde foram agrupados em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, abrigando um total de 5 animais por caixa. Estes animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), bem como a iluminação, seguiram o ciclo claro-escuro de 12h, com as luzes acesas às 7h e desligadas às 19h. Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum* durante todo período experimental. Os procedimentos experimentais também foram realizados a uma temperatura controlada (23 ± 1 °C).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA-UNIFAL) número 0008/2019 que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais para fins de pesquisa científica, da Unifal-MG.

4.1.2 Grupos experimentais animais

Nos procedimentos experimentais os animais foram divididos em quatro grupos (n = 8 por grupo):

- Animais não diabéticos tratados com veículo (solução salina 0,9% 1mL/i.p.)
- Animais não diabéticos tratados com inibidor IDO1 (Norharmane[®]),
- Animais diabéticos tratados com veículo (solução salina 0,9% 1mL/i.p.),
- Animais diabéticos tratados com inibidor IDO1 (Norharmane[®]).

Para a indução do diabetes experimental em ratos, realizamos a administração de aloxana[®] (ver delineamento experimental descrito abaixo). Um acréscimo de 25% no número total de animais (n=8) foi necessário, considerando a probabilidade de perdas relacionadas aos efeitos tóxicos da droga, a qual está relacionada a uma taxa

de mortalidade relativa (LERCO *et al.*, 2003).

4.1.3 Delineamento Experimental

Os animais advindos do biotério central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, passaram por um período de sete dias para ambientação no biotério do laboratório de Fisiologia Translacional. Após esse período de adaptação, a alodinia (limiar basal dos animais – Tempo 0) foi realizada utilizando os filamentos de von Frey em todos os grupos experimentais (N = 36), com o objetivo de verificar se os animais apresentavam alterações no limiar de dor.

Após essa etapa, 16 animais foram sorteados para compor os grupos controle: Grupo 1 - animais não diabéticos tratados com veículo (solução salina 0,9% 1mL/i.p. N=8); Grupo 2 - animais não diabéticos tratados com inibidor IDO-1 (norharmane N=8). Outros 16 animais receberam a injeção intraperitoneal de aloxana (150 mg/Kg) dissolvida em solução salina 0,9% administrada em dose única para indução do diabetes experimental.

A confirmação do diabetes nos ratos foi realizada 48h após a administração de aloxana (150 mg/Kg) através da dosagem da glicose em jejum (amostra de sangue dos animais). Após a confirmação do diabetes experimental, os 16 animais (diabéticos) foram divididos em dois grupos de 8 animais; Grupo 3 - animais diabéticos tratados com veículo (solução salina 0,9% 1mL/i.p.); Grupo 4 - animais diabéticos tratados com norharmane (3mg/Kg), por 4 dias consecutivos. Após essa etapa, realizamos os seguintes testes comportamentais: teste de alodinia e teste de campo antes e até o 4º dia após o início do tratamento farmacológico.

No primeiro dia, após o tratamento farmacológico com norharmane (3mg/Kg), os animais foram submetidos ao teste de campo aberto.

No dia subsequente, os animais foram submetidos ao treinamento no aparato de nado forçado conforme protocolo e também foi avaliado a alodinia utilizando os filamentos de von Frey, antes e 3 horas após o tratamento com norharmane.

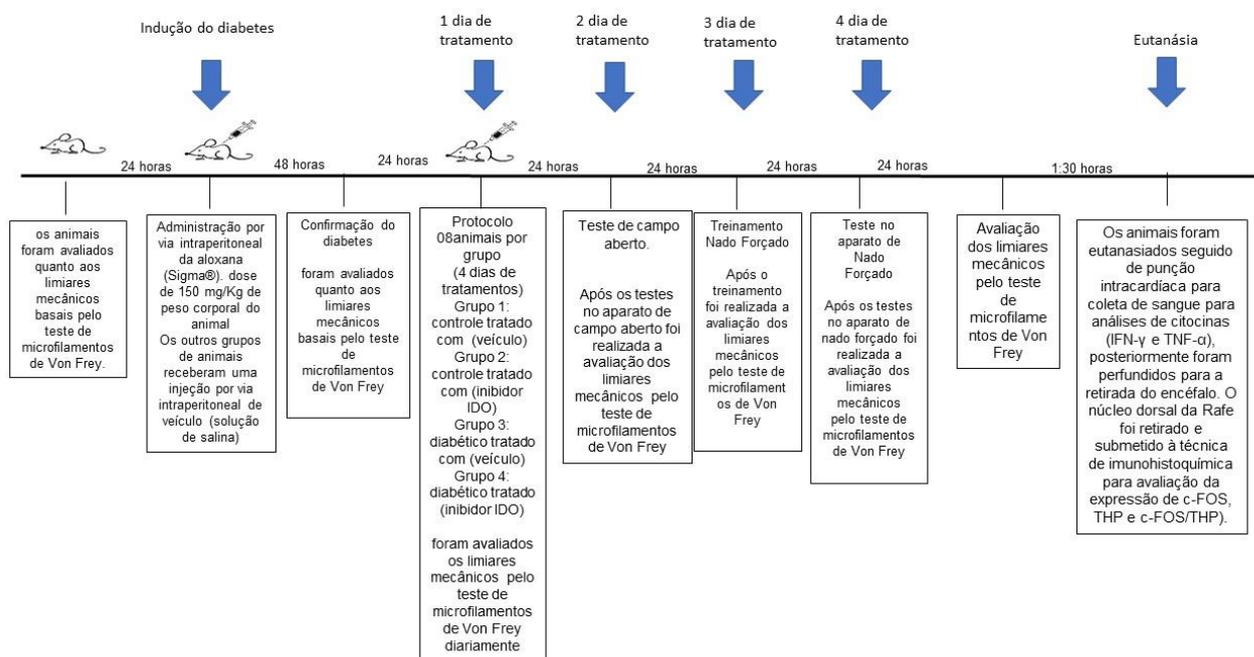
No terceiro dia os animais foram submetidos ao teste de nado forçado e novamente foi avaliado a alodinia utilizando os filamentos de von Frey, antes e após o tratamento com norharmane.

No quarto dia os animais tiveram novamente foi avaliado a alodinia utilizando os filamentos de von Frey. Uma hora e trinta minutos após a avaliação do limiar de

dor, os animais foram eutanasiados com tribromoetanol (TBE) 250 mg/kg. Na sequência, foi realizada punção intracardíaca para coleta de sangue para dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α).

E, finalmente os animais foram perfundidos com salina e paraformaldeído 4% para a retirada do encéfalo. O núcleo dorsal da rafe foi dissecado e congelado para futuras avaliações de imunohistoquímica para avaliação da expressão de c-FOS, THP e c-FOS/THP).

Figura 3 - Representação do cronograma experimental



FONTE: Do autor

4.1.4 Indução do diabetes *Mellitus* em ratos

Para indução de diabetes, os animais foram pesados e submetidos a jejum por 12 horas. Após o período de jejum, foi administrado aloxana na dose de 150 mg/Kg em solução de salina 0,9%. O grupo controle recebeu a injeção por via intraperitoneal de veículo (solução salina 0,9% 1mL/i.p.) A confirmação do diabetes nos ratos foi realizada 48h após a administração de aloxana. Os animais tiveram suas caudas picadas com agulha estéril e uma gota de sangue foi coletada e inserida na fita do glicosímetro para análise. Então foram considerados diabéticos apenas os animais

que apresentaram glicemia em jejum igual ou superior a 200 mg/dL (LERCO, 2003; MAZZANTI *et al.*, 2003)

4.1.5 Caracterização da diabetes mellitus

A caracterização do distúrbio metabólico dos animais pelo diabetes foi com base na avaliação: do peso corpóreo, onde os animais foram pesados antes e após a aplicação da injeção intraperitoneal de aloxana (Sigma-Aldrich, USA), para determinação do peso corporal total inicial e final.

Para avaliação do perfil bioquímico (glicose), foram coletadas amostras de sangue obtidas da ponta da cauda dos animais. Esse sangue foi colocado em glicofitas da marca Accu-Chek® e a leitura foi realizada de imediato por meio do glicosímetro *Accu-Chek®*.

4.1.6 Estudo da participação da via das quinureninas

O tratamento farmacológico foi realizado utilizando o inibidor da enzima IDO1 - norharmane (Sigma-Aldrich, USA), administrando a dose de 3mg/Kg i.p. dissolvida em solução salina 0,9%. A administração da droga foi realizada 1 vez ao dia por 4 dias consecutivos após a avaliação do limiar nociceptivo basal diário utilizando o teste de von Frey.

4.1.7 Avaliação do limiar de dor

A avaliação do limiar de dor nos animais (alodinia) foi realizada utilizando os filamentos de von Frey (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA) que expressam quantidades crescentes de massa dos filamentos determinadas em gramas (CHAPLAN; MALMBERG; YAKSH, 1997).

O teste consiste em inserir os animais em caixas de acrílico individuais, posicionadas sobre uma tela de arame maleável, proporcionando acesso à pata dos animais. Os mesmos permaneceram em ambientação por aproximadamente 20 minutos. Os filamentos foram posicionados perpendicular e diretamente na pata dos animais e, na sequência foi induzida uma pressão em força (convertido em gramas)

por um período de 4 segundos ou até que os animais exibissem um reflexo de retirada da pata semelhante à reação de flinch. Para uma resposta completa, o animal foi submetido a seis avaliações sequenciais utilizando os filamentos de von Frey, método conhecido como Up and Down (DIXON, 1980).

Na primeira avaliação nociceptiva foi utilizado o filamento de von Frey mediano, correspondente a 8g, e os demais filamentos foram utilizados conforme a resposta do filamento anterior. Dessa forma, em caso de resposta positiva um filamento de menor calibre foi aplicado na pata do animal, e em caso de resposta negativa utilizava-se um calibre maior. É importante mencionar que todas as avaliações nociceptivas tiveram um intervalo de 30 segundos entre as aplicações dos diferentes filamentos, evitando dessa forma, uma resposta induzida pelo filamento anterior.

4.1.8 Avaliação do deslocamento exploratório em campo aberto

O campo aberto (*open field*), além de ser um modelo preditivo de parâmetros de ansiedade, é um teste útil para análise da atividade locomotora do animal, pois permite quantificar a atividade motora espontânea (VILELA, 2008). O aparato do campo consiste de uma arena circular de acrílico, com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura, com o piso dividido em quadrantes, dos quais 8 áreas junto às paredes do aparato são consideradas periferia e os 4 demais as centrais.

Os ratos foram colocados no centro arena e a sua atividade locomotora, caracterizada quando o animal atravessava uma linha e colocava as 4 patas dentro de um mesmo quadrado foi observada. Foram avaliados o número de cruzamentos com as quatro patas no centro, na periferia, total de *rearings* (exploração vertical) e o efeito anti-tigmotático (número de entradas no centro/número total de entradas) durante a filmagem de cinco minutos (VALLE, 1970).

Após cada teste, o campo aberto foi limpo com álcool 10%. A análise foi realizada por meio da observação dos vídeos obtidos por filmagem de cada experimento e o mesmo foi realizado após reexposição ao *freezing* em todos grupos experimentais.

Figura 4 - Representação do cronograma experimental



Fonte: SCIENLABOR (1990)

4.2 PESQUISA CLÍNICA EM PACIENTES DIABÉTICOS

4.2.1 Seleção da amostra e aspectos éticos

Para o desenvolvimento do objetivo relacionado à experimentação em humanos, foram selecionados pacientes provenientes dos ambulatórios e Programa de Saúde da Família da Secretaria Municipal de Saúde do Município de Patos de Minas - MG. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética da Faculdade Patos de Minas (CEP-FPM) e aprovado sob o número do parecer 3.543.526 CAAE 18795719.0.0000.8078.

Os participantes incluídos na pesquisa receberam as devidas informações sobre o projeto de pesquisa e sua participação voluntária, de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Esse documento ressaltou também que a sua não aceitação ou retirada do estudo em qualquer etapa da pesquisa científica, não implicaria em nenhuma alteração do serviço prestado pela Secretaria Municipal de Saúde do município de Patos de Minas-MG

4.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram: indivíduos de ambos os sexos com diagnóstico de diabetes (grupo diabéticos), indivíduos de ambos os sexos saudáveis (grupo controle) com idade mínima de 18 anos e máxima de 70 anos.

Os critérios de exclusão foram gravidez, pacientes em investigação ou com diagnóstico de câncer, doença de base e/ou com sorologias positivas para doença de Chagas, hepatite B, hepatite C e HIV, outras condições responsáveis por dor crônica e presença de doenças vasculares (obstrutivas).

4.2.2.1 Riscos

Probabilidade de perda dos prontuários dos pacientes a serem analisados. Entretanto, para minimizar esse risco, os prontuários serão analisados na própria secretaria municipal de saúde, sendo proibida a sua retirada.

Riscos físicos poderão ser induzidos por procedimentos invasivos (agulha para coleta de sangue). Para minimizar esse risco, profissionais treinados serão recrutados para realizar a coleta do sangue periférico. Outro risco de magnitude importante é a possível contaminação transversal com material biológico. Para minimizar esse risco os profissionais irão utilizar equipamentos de proteção individual adequados e, se mesmo assim houver contágio, os profissionais serão encaminhados para hospitais especializados para que sejam tomadas as devidas providências cabíveis, minimizando de forma significativa a contaminação cruzada.

4.2.2.2 Benefícios

Com base nos resultados apresentados na revisão bibliográfica acreditamos que nosso trabalho seja viável, promissor e também possa ser útil para melhor compreender o mecanismo pelo qual esta enzima participa da indução e manutenção da dor neuropática associada ao diabetes e a depressão. Nesse sentido poderá ser de grande importância para o controle da dor de origem neuropática, como também ser um novo alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos para o controle da dor neuropática diabética.

4.2.3 Coleta das amostras

Inicialmente, foi realizada a abordagem junto aos pacientes fornecendo orientações quanto aos procedimentos necessários para a coleta das amostras de sangue e urina. Os exames laboratoriais realizados nesta etapa foram as dosagens de glicohemoglobina HBA1c, glicose média estimada, serotonina total e quantificação do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA).

Os pacientes também foram orientados a não ingerir os seguintes alimentos: abacate, ameixa, abacaxi, banana, beringela, nozes, tomate e picles nas 24 horas que antecederam a coleta. Foi também realizada uma triagem quanto aos medicamentos utilizados, a fim de se evitar interferentes.

Para a dosagem de glicohemoglobina HBA1c e glicose média estimada uma amostra de sangue periférico dos pacientes, após punção venosa, foi colhida em tubos a vácuo contendo anticoagulante padrão (Tubos Vacuete® de 5mL com EDTA, produzidos pela Greiner Bio One®). Já para a dosagem de serotonina, foi coletado sangue periférico, colhidos em tubos a vácuo contendo gel separador e posteriormente centrifugados para obtenção do soro (Tubos Vacuete® de 5mL produzidos pela Greiner Bio One®).

Para a obtenção e posterior quantificação do metabólito 5-HIAA) os pacientes foram orientados que para realização do exame seria necessário à coleta de urina por um período de 24 horas em frasco próprio. Os frascos plásticos da marca PROLAB® na cor âmbar foram preparados no laboratório, sendo inserida uma solução de ácido clorídrico SYNTH® HCL 6N (HCL 50%), na proporção de 0,10% urina-conservante. As amostras foram condicionadas em refrigerador para posterior dosagens, respeitando seu período de estabilidade que é de 5 dias.

As análises foram realizadas em dois laboratórios terceirizados, um no município de Patos de Minas- MG e outro em Belo Horizonte – MG. As dosagens de glicohemoglobina e a obtenção da glicemia média estimada foram realizadas no laboratório localizado em Patos de Minas –MG no equipamento *Capillaris 2®*, que utiliza a metodologia de eletroforese capilar, esse método é certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP).

As dosagens de serotonina total e a quantificação do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), foram realizadas no laboratório sediado em Belo Horizonte –

MG nos equipamentos (RIE®) e (*ThermoFisher*®), que utilizam a metodologias de radioimunoensaio e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), respectivamente.

4.2.4 Dosagem de HBA1c (Glicohemoglobina e glicose média estimada)

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo EDTA (*Greiner Bio One*®) e foram processadas de maneira contínua, diariamente, à medida que as amostras foram obtidas conforme critérios de inclusão e exclusão descritos acima.

Antes dos ensaios o equipamento foi devidamente calibrado utilizando amostras de controle de qualidade comercial em dois níveis (*Sebia Lisses, France*), em conformidade com as melhores práticas laboratoriais. O equipamento utilizado foi certificado e calibrado pelo *Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) e possuem rastreabilidade dos reativos para o *DCCT Research Group*.

Após a validação do equipamento pelo controle de qualidade, as amostras foram inseridas nas *racks* do equipamento automatizado (*Capillarys Sebia*®) que imediatamente promoveu a homogeneização das amostras por inversão.

O sistema *Capillarys Sebia*® utiliza o princípio da eletroforese capilar em solução livre, onde as moléculas carregadas são separadas por sua mobilidade eletroforética em um pH específico em tampão alcalino. A separação ocorre de acordo com o pH e o fluxo eletroosmótico.

Cada amostra é diluída em tampão de diluição e os capilares são preenchidos com o tampão de separação; as amostras são então injetadas por aspiração na extremidade anódica do capilar. Uma separação de alta tensão é então realizada; a detecção e quantificação direta das diferentes frações é realizada em um comprimento de onda específico na extremidade catódica do capilar. Após a análise, os capilares foram imediatamente limpos com uma solução de lavagem e depois reabastecidos com tampão em preparação para as próximas amostras.

4.2.5 Dosagem de serotonina total

As amostras de sangue foram utilizadas para a dosagem de serotonina total em pacientes diabéticos e não diabéticos. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo gel separador *Greiner Bio One®* e processadas para obtenção do soro e na sequência, congeladas (-20°C).

A metodologia utilizada para quantificação da serotonina total foi o radioimunoensaio, ensaio esse onde há uma competição entre um componente radioativo e um antígeno não radioativo para um número fixo de locais de ligação a anticorpos. A quantidade de antígeno marcado com ¹²⁵I ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de analito da amostra.

Na preparação e acilação de amostras, foram pipetados 25 µL de padrões, controles e amostra nos respectivos tubos. Em seguida foram adicionados 250 µL de tampão de acilação a todos os tubos e 25 µL de reagente de acilação. A solução resultante foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente e posteriormente 2 ml de água ultra-pura foram adicionados em todos os tubos.

Foram utilizadas líquotas 25 µL dos padrões, controles e amostras acilados. Em seguida foi adicionado 50 µL de serotonina ¹²⁵I em todos os tubos. Posteriormente, 50 µL de anti-soro de serotonina foi adicionado aos tubos (exceto controle). Na sequência as amostras foram incubadas por 90 minutos (2-8°C). Após a incubação, 500 µL do reagente precipitante foi adicionado em todos os tubos e foram homogeneizados e foram incubados à 2-8°C por 15 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (3.000 x g) em centrífuga refrigerada descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi utilizado para quantificação de serotonina em ng/ml.

4.2.6 Dosagem de metabólito de serotonina (5HIAA)

O volume urinário de 24 horas de pacientes diabéticos e não diabéticos foram utilizados para dosagem de 5-HIAA. A técnica empregada para dosagem do analito foi a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) seguindo rigorosamente os procedimentos do fabricante (*Kit Chromystems*). Alíquota de 200 µl da amostra de urina acidificada foi acrescida de 100 µl de padrão interno.

Em seguida, foi adicionado 700 µl de reagente de precipitação com posterior homogeneização. Após essa etapa as amostras foram centrifugadas (2 min à 10000 x g). Diluiu-se então 500 µl de sobrenadante com 500 µl de água ultrapura, nova

homogeneização foi realizada e injetou-se 10–20 µl desta solução no sistema HPLC. uma coluna cromatográfica (C-18 medindo 150 x 4,6 mm com partículas de 5 µm – Shimpak) com filtro de linha, um detector eletroquímico e um integrador modulado Chromatopa foram utilizadas. A técnica utilizada é a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando um software *GraphPad* versão 7.0 e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Para comparação de dois grupos independentes foi aplicado o teste “t” de Student.

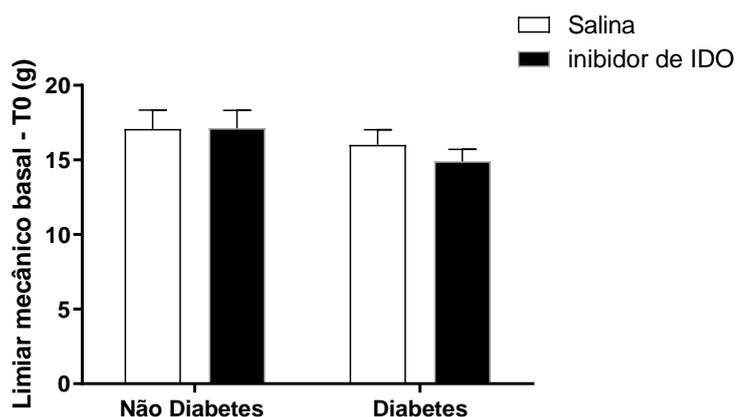
No teste para comparação de três grupos ou mais, foi utilizado a análise de variância *two way ANOVA*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO LIMIAR DE DOR (ALODINIA) ANTES DA INDUÇÃO DO DIABETES

Os animais foram colocados no aparato de von Frey para permitir ambientação por aproximadamente 30 minutos. Na sequência, a alodinia foi avaliada utilizando os filamentos de von Frey com o objetivo de verificar se os animais naive não apresentavam variações no limiar de dor antes da indução do diabetes experimental (T0) (Figura 5).

Figura 5 - Avaliação do limiar de dor em animais naive



FONTE: Do autor

NOTA: A alodinia foi avaliada em animais naive antes da indução do diabetes experimental utilizando os filamentos de von Frey. Os resultados são expressos pela média (\pm EPM) de 8 animais por grupo.

Fonte do autor.

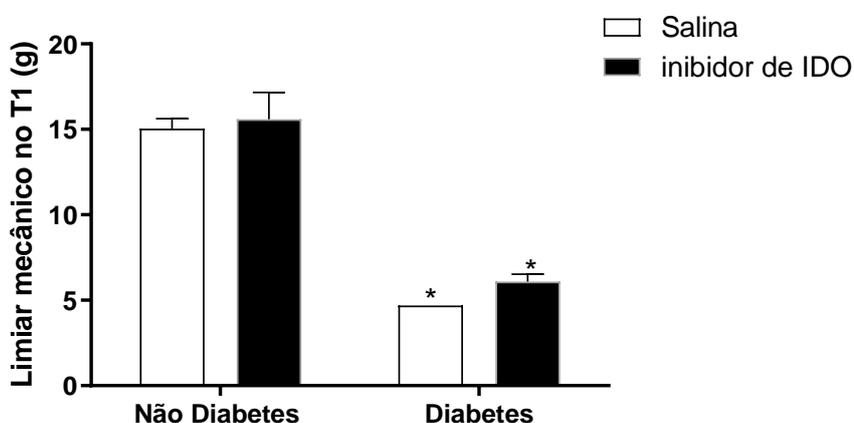
5.2 DIABETES EXPERIMENTAL INDUZ NOCICEPÇÃO MECÂNICA EM RATOS

Após verificar normalidade no limiar de dor nos animais (Figura 5), realizamos a administração de aloxana (150 mg/Kg) diluída em solução de salina 0,9% com volume final de 1mL, com o objetivo de induzir diabetes experimental. O grupo controle recebeu a administração de veículo (solução salina 0,9%) com volume equivalente.

É conhecido que alterações nos níveis de glicose “diabetes” em ratos pode

também induzir dor aguda e neuropatia diabética, sendo esta última uma importante complicação diabética (JOLIVALT *et al.*, 2016). Dessa forma, com o objetivo de avaliar se o tratamento dos animais com aloxana (150 mg/Kg) o qual gera diabetes experimental poderia induzir dor, foi avaliada a alodinia nos ratos, utilizando os filamentos de von Frey. Podemos observar na figura 6 que os animais que receberam a injeção de aloxana (150 mg/Kg) apresentaram alodinia quando comparado aos respectivos grupos controles.

Figura 6 - Aloxana administrada por via intraperitoneal induz alodinia em ratos



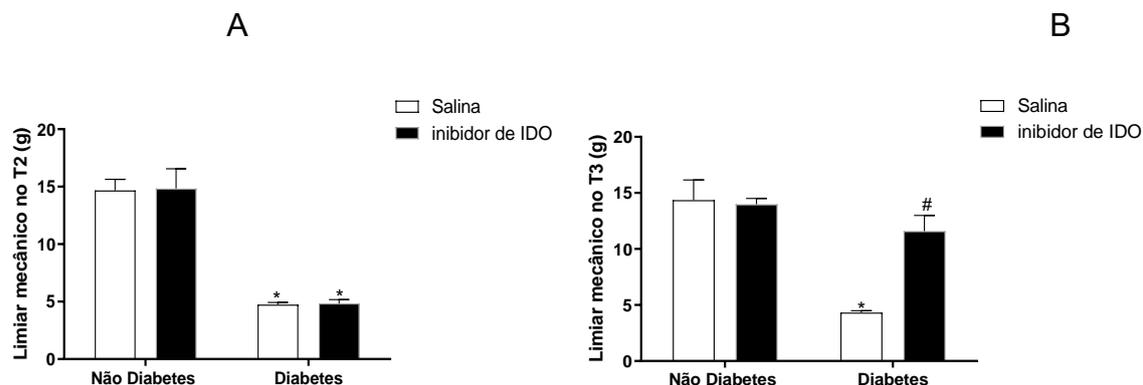
FONTE: Do autor

NOTA: A injeção de aloxana (150 mg/Kg/1mL /i.p) ou veículo (1 mL/i.p) foi realizada e 48 horas após da indução do DM foi avaliada a alodinia usando filamentos de von Frey. Os resultados são expressos pela média (\pm EPM) de 8 animais por grupo. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com ratos tratados com veículo.

5.3 PAPEL DA ENZIMA IDO-1 NA REDUÇÃO DA ALODINIA

Após confirmação da alodinia nos animais iniciamos o tratamento farmacológico com inibidor da IDO-1 (norharmane - 3mg/kg/i.p.) dissolvida em solução salina com volume final de 1mL. A figura 6A mostra a alodinia antes do tratamento farmacológico e a Figura 6B mostra a alodinia após o tratamento farmacológico com (norharmane - 3mg/kg/i.p.). Verificamos que a administração do inibidor da enzima IDO-1 reduziu a alodinia, sugerindo dessa forma o envolvimento da enzima IDO-1 na dor neuropática experimental (Figura 7).

Figura 7 - Efeito do norharmane na alodinia – 1o dia de tratamento

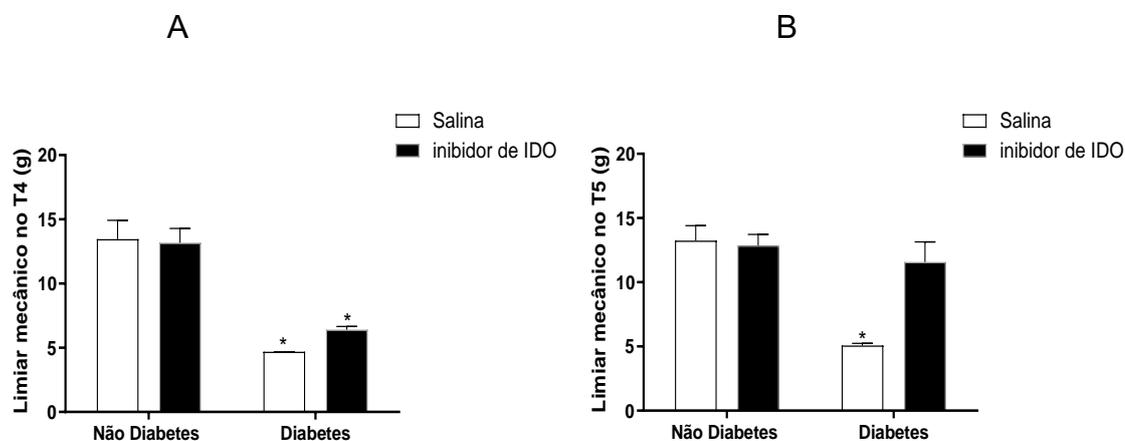


FONTE: Do autor

NOTA: Avaliação da alodinia foi realizada em animais diabéticos e em animais controle utilizando os filamentos de von Frey (Fig. 6A). Avaliação da alodinia realizada após a 3ª hora da administração do inibidor da enzima IDO-1 (norharmane 3mg/kg/i.p.) (Fig.6B) Os resultados são expressos pela média (\pm EPM) de 8 animais por grupo. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com ratos tratados com veículo.

O segundo, terceiro e quarto dia após o tratamento com inibidor da IDO-1 (norharmane 3mg/kg/i.p.) ou veículo (solução salina 0,9% 1mL/i.p.) também foi capaz de reduzir a alodinia nos ratos diabéticos. Esta redução foi tornando-se cada vez mais expressiva (Figuras 8, 9 e 10). A figura A mostra a alodinia antes do tratamento farmacológico e a figura B mostra a alodinia após o tratamento farmacológico com inibidor IDO-1 ou solução salina.

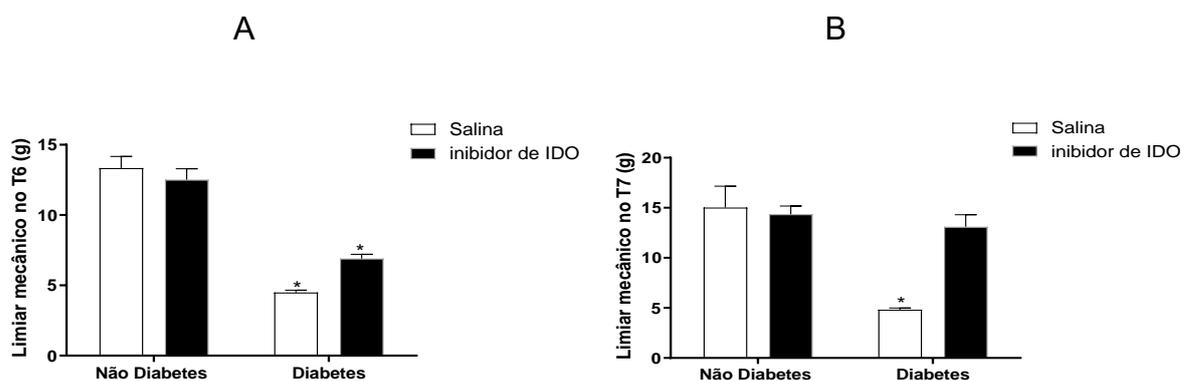
Figura 8 - Efeito do norharmane na alodinia– 2o dia de tratamento



FONTE: Do autor

NOTA: Avaliação da alodinia foi realizada em animais diabéticos e em animais controle antes da administração de norharmane (Fig. 7A). Avaliação da alodinia foi realizada após a 3ª hora da administração do inibidor da enzima IDO-1 (norharmane 3mg/kg/i.p.) (Fig. 7B). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM) de 8 animais por grupo. * indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) quando comparado com ratos tratados com veículo.

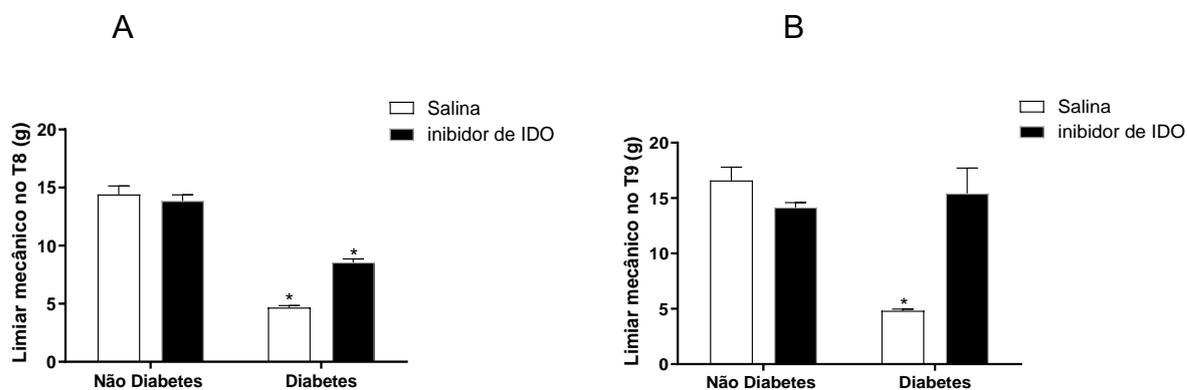
Figura 9 - Efeito do norharmane na alodinia – 3o dia de tratamento



FONTE: Do autor

NOTA: Avaliação da alodinia foi realizada em animais diabéticos e em animais controle antes da administração de norharmane (Fig. 8A). Avaliação da alodinia foi realizada após a 3 hora da administração do inibidor da enzima IDO-1 (norharmane 3mg/kg/i.p.) (Fig. 8B). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM) de 8 animais por grupo. * indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) quando comparado com ratos tratados com veículo.

Figura 10 - Efeito do norharmane na alodinia – 3o dia de tratamento
norharmane na alodinia – 4º dia de tratamento



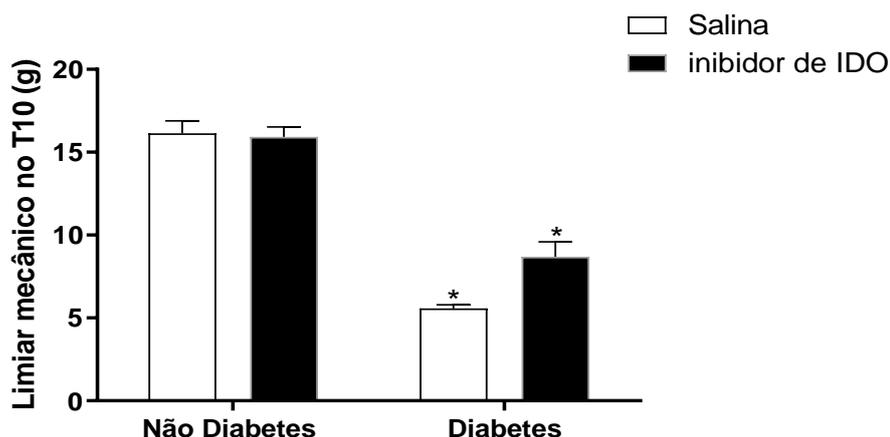
FONTE: Do autor

NOTA: Avaliação da alodinia foi realizada em animais diabéticos e animais controle antes da administração de norharmane (Fig. 9A). Avaliação da alodinia foi realizada após a 3 hora da administração do inibidor da enzima IDO1 (norharmane 3mg/kg/i.p.) (Fig. 9B). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM) de 5 animais por grupo. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com ratos tratados com veículo.

5.4 AVALIAÇÃO DA ALODINIA – 5º DIA DE EXPERIMENTAÇÃO

No 5º dia de experimento (após término do tratamento diário com o inibidor da enzima IDO1 – norharmane) realizamos a avaliação da alodinia e verificamos que os animais estavam com uma pequena redução da alodinia, entretanto, não houve diferença significativa quando comparado aos animais controle (diabéticos tratados com salina) sugerindo que o inibidor da enzima IDO-1 reverte a alodinia, entretanto, provavelmente pela farmacocinética da droga (norharmane) o efeito em reduzir a alodinia (figura 11).

Figura 11 - Avaliação da alodinia após o fim do tratamento farmacológico



FONTE: Do autor

NOTA: Avaliação da nocicepção mecânica foi realizada em animais diabéticos e animais controle. Os resultados são expressos pela média (\pm EPM) de 8 animais por grupo. * indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) quando comparado com ratos tratados com veículo.

5.5 AVALIAÇÃO TEMPORAL DA ALODINIA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE NORHARMANE

A figura 12 mostra a alodinia na dor induzida pelo DM e o tratamento farmacológico com inibidor da IDO-1 (norharmane 3mg/kg/i.p.) ou veículo (solução salina 0,9% 1mL/i.p.) por 4 dias consecutivos utilizando os filamentos de von Frey. Observa-se que antes da indução do DM (BL) os animais não apresentaram alodinia. Entretanto, na 48^a hora após a indução do diabetes (T1) podemos observar alodinia no grupo dos animais diabéticos quando comparado aos grupos controle.

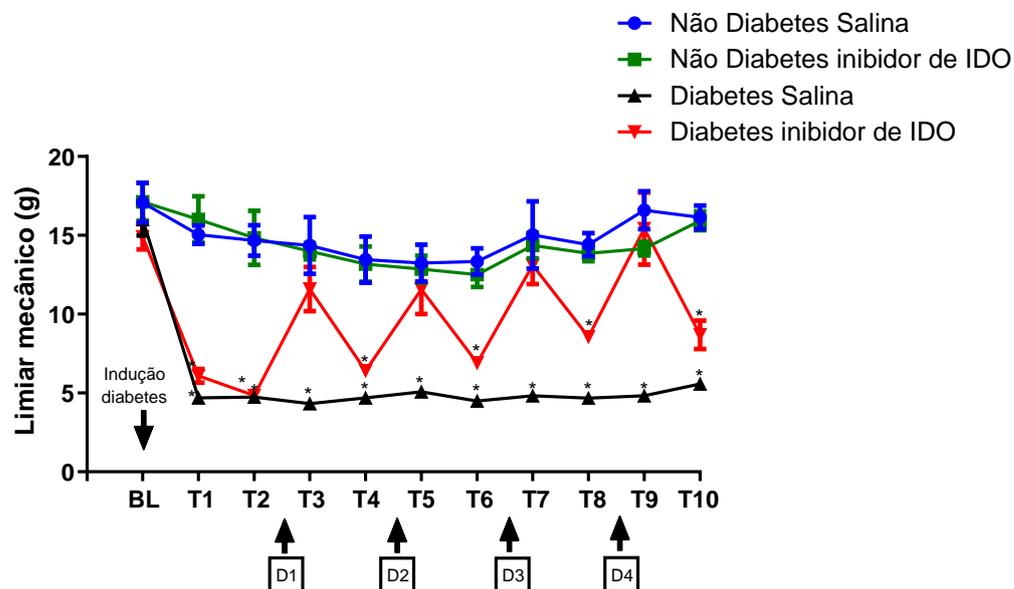
No 3 dia após a indução do diabetes (T2) a dor foi novamente avaliada e podemos observar que os animais do grupo DM permanecem com alodinia, sugerindo que o diabetes induz quadro de dor podendo ser sugestiva à dor diabética neuropática.

Na sequência (T3) foi administrado o inibidor da enzima IDO-1 norharmane

(3mg/kg/i.p.) e 3 horas após foi avaliada a alodinia utilizando os filamentos de von Frey. Podemos verificar que o inibidor da IDO-1 reverteu a alodinia induzida pelo DM. O T4 representa a avaliação da dor nos animais no 2º dia de tratamento farmacológico antes da administração de norharmane (3mg/kg/i.p.) e o T5 representa a 3ª hora após a administração do inibidor da IDO-1 norharmane (3mg/kg/i.p.). O T6 representa a avaliação da dor no 3º dia de tratamento farmacológico antes da administração do inibidor enzima IDO-1 norharmane (3mg/kg/i.p.) e o T7 representa a 3ª hora após a administração do inibidor da enzima IDO-1. O T8 representa a avaliação da dor no 4º dia de tratamento farmacológico antes da administração da administração de norharmane (3mg/kg/i.p.) e o T9 representa a 3ª hora após a administração do inibidor da IDO-1 norharmane (3mg/kg/i.p.). O T10 representa o liminar nociceptivo mecânico 24 horas após a administração norharmane (3mg/kg/i.p.) no 5º dia de experimentação (aqui não houve tratamento farmacológico. Na sequência, os animais foram eutanasiados com tribromoetanol (TBE) 250 mg/kg.

Em seguida, foi realizada punção intracardíaca para coleta de sangue para dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α). E, finalmente os animais foram perfundidos com paraformaldeído 4% para a retirada do encéfalo. O núcleo dorsal da rafe foi dissecado e congelado para futuras avaliações de imunohistoquímica para avaliação da expressão de c-FOS, THP e c-FOS/THP).

Figura 12 - Efeito do norharmane na alodinia – tratamento farmacológico por 4 dias consecutivos



FONTE: Do autor

NOTA: Avaliação da alodinia foi realizada antes da indução do DM (BL) e após o DM realizando o tratamento farmacológico com o inibidor da enzima IDO1 (norharmane 3mg/kg/i.p.) por 4 dias consecutivos. D1, D2, D3 e D4 representam o 1º, 2º, 3º e 4º dia de tratamento farmacológico respectivamente. Os resultados são expressos pela média (\pm EPM) de 8 animais por grupo. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com ratos tratados com veículo.

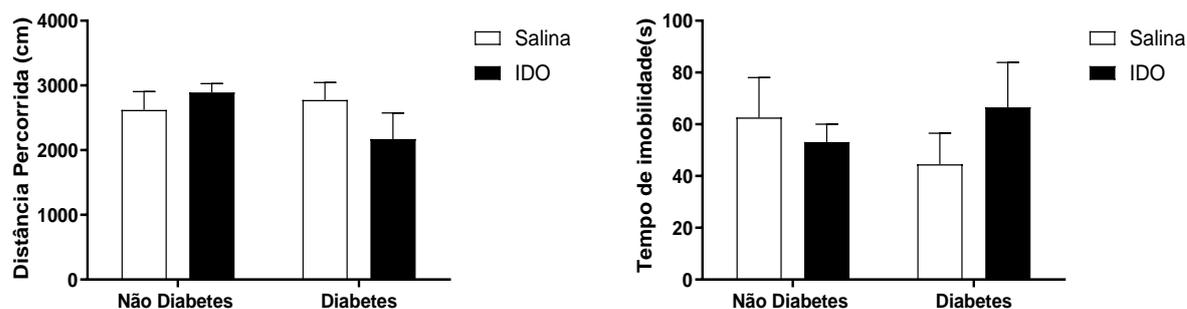
6.6 AVALIAÇÃO DO DESLOCAMENTO EXPLORATÓRIO DOS ANIMAIS NO TESTE DE CAMPO ABERTO (*OPEN FIELD*)

A figura 13 mostra a avaliação da atividade locomotora dos animais diabéticos e seu respectivo grupo controle no teste comportamental de campo aberto após o tratamento com o inibidor da IDO1 (norharmane 3mg/kg/i.p.) ou veículo (solução salina 0,9% 1mL/i.p.) Verificamos que não houveram diferenças estatísticas significativas entre a distâncias percorridas e no tempo de imobilidade dos animais. Fato que pode explicar nosso resultado negativo é a utilização dos mesmos animais utilizados para a avaliação da alodinia utilizando os filamentos de von Frey, favorecendo dessa forma a indução de estresse nos animais, prejudicando os resultados aqui apresentados.

Figura 13 - Efeito norharmane no teste de campo aberto

A) Avaliação da distância percorrida

B) Tempo de imobilidade



FONTE: Do autor

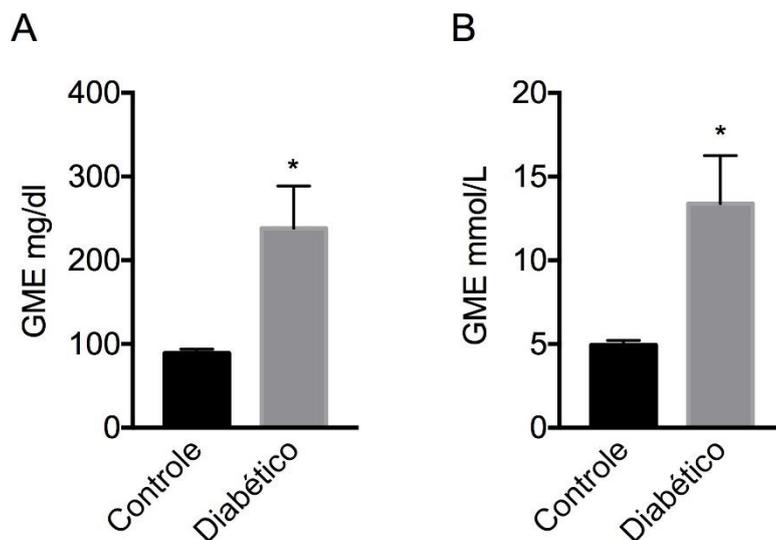
NOTA: Avaliação da distância percorrida e o tempo de imobilidade foi realizada em animais diabéticos após o tratamento farmacológico com o inibidor da enzima IDO1 (norharmane 3mg/kg/i.p.) e veículo. Os resultados são expressos pela média (\pm EPM) de 8 animais por grupo.

5.7 RASTREIO E CARACTERIZAÇÃO DO DIABETES ATRAVÉS DA GLICOHEMOGLOBINA EM HUMANOS

Foram selecionados para compor os grupos experimentais pacientes com DM, sem limite de tempo do diagnóstico e pacientes não portadores de DM oriundos dos ambulatórios e Programa de Saúde da Família da Secretaria Municipal de Saúde do Município de Patos de Minas - MG.

Além de ser um marcador de controle glicêmico, mais recentemente, a A1C passou a ser utilizada como teste de rastreio ou mesmo de diagnóstico para o diabetes adicionalmente ao teste de glicemia de jejum e do teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Os resultados são apresentados na figura 14 e 15 confirmam o perfil diabético nos pacientes devido aos valores aumentados de glicohemoglobina A1C.

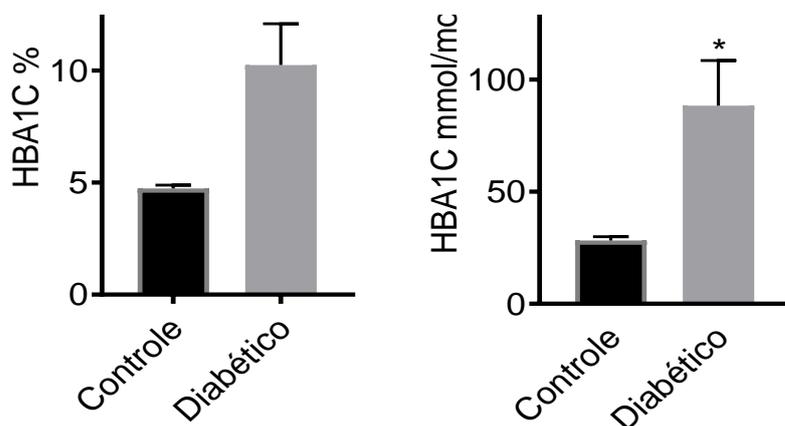
Figura 14 - Perfil glicêmico de pacientes diabéticos e não diabéticos



FONTE: Do autor

NOTA: A concentração de glicose média estimada com base na glicohemoglobina foi obtida considerando os grupos experimentais (controle n=25; diabéticos n= 31). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM). * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com pacientes não diabéticos.

Figura 15 - Dosagem de HBA1C de pacientes diabéticos e não diabéticos



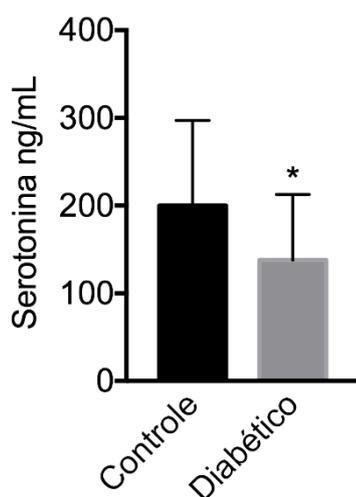
FONTE: Do autor

NOTA: A concentração de HBA1C foi obtida considerando os grupos experimentais (controle n=25; diabéticos n= 31). Os resultados foram expressos pela média (\pm EPM). * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com pacientes não diabéticos.

5.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SEROTONINA TOTAL (5HT) EM SORO DO PACIENTES DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS

Serotonina é um importante neurotransmissor envolvido na via descendente inibitória e ainda, sua redução no SNC está envolvida com o desenvolvimento de depressão maior (TABAK *et al.*, 2014). Dessa forma, avaliamos os níveis de serotonina no soro de pacientes diabéticos com o objetivo de encontrar variações nos níveis de serotonina com a dor neuropática diabética. Verificamos que os níveis de serotonina do pacientes diabéticos foram significativamente menores do que nos pacientes não diabéticos (Figura 16).

Figura 16 - Dosagem de serotonina em pacientes diabéticos e não diabéticos



FONTE: Do autor

NOTA: A concentração de serotonina foi avaliada por radioimunoensaio em pacientes diabéticos e não diabéticos (controle n=25; diabéticos n= 31). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM). * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com pacientes não diabéticos.

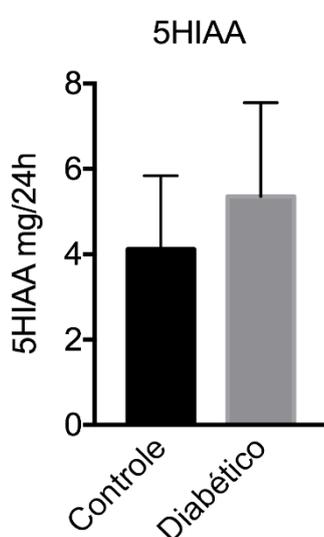
5.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÁCIDO 5-HIDROXIINDOLACÉTICO (5-HIAA) EM PACIENTES DIABÉTICOS

O ácido 5-hidroxiindolacético é o principal produto do metabolismo da

serotonina, nesse sentido, realizamos a dosagem desse metabólito na urina de pacientes diabéticos e não diabéticos com o objetivo de encontrar variações na formação de 5-HIAA com a dor neuropática.

Os resultados mostram que os pacientes diabéticos apresentaram maiores níveis de 5-HIAA na urina quando comparados aos pacientes não diabéticos (Figura 17).

Figura 17 - Dosagem de 5-HIAA em pacientes diabéticos e não diabéticos



FONTE: Do autor

NOTA: A concentração do metabólito 5HIAA foi realizada por HPLC em pacientes diabéticos e não diabéticos (controle n=25; diabéticos n= 31). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM).

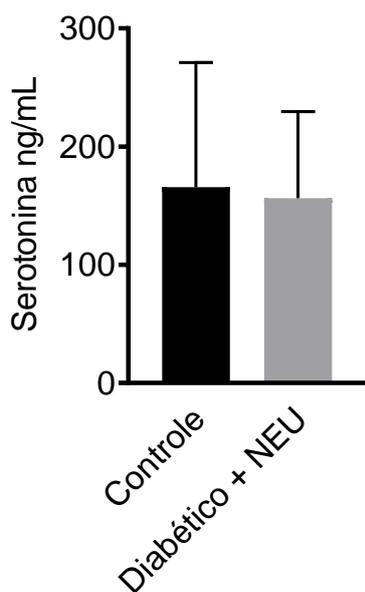
5.10 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SEROTONINA EM PACIENTES DIABÉTICOS ASSOCIADOS COM NEUROPATIA

Os níveis de serotonina também foram comparados entre os pacientes diabéticos e aqueles diabéticos diagnosticados com dor neuropática. Para a caracterização dos pacientes diagnosticados com neuropatia foi realizada uma busca nos prontuários eletrônicos dos participantes da pesquisa para obter os dados necessários para a análise comparativa.

Foram considerados pacientes já diagnosticados e em tratamento para neuropatia. Entretanto, quando separamos os pacientes diabéticos sem dor

neuropática, dos diabéticos com neuropatia, não encontramos diferença significativa nos níveis de 5HT. Muito provavelmente devido ao baixo número experimental que certamente favorece o aumento do erro experimental (Figura 18).

Figura 18 - Dosagem de serotonina em pacientes diabéticos e diabéticos neuropatas



FONTE: Do autor

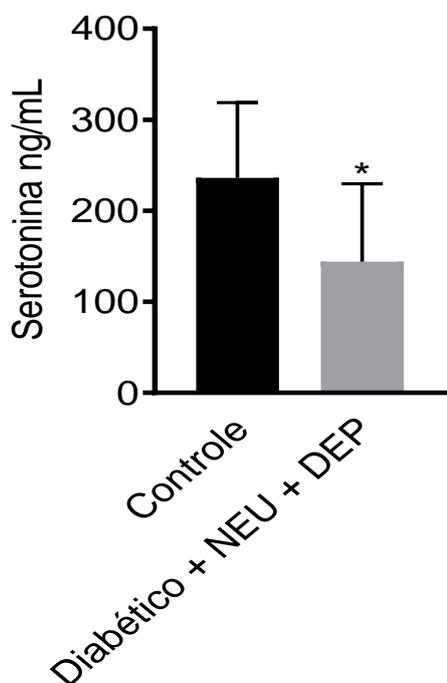
NOTA: A concentração de serotonina foi avaliada por radioimunoensaio em pacientes diabéticos e não diabéticos (controle diabéticos, n=16) e diabéticos com neuropatia associada (n=11). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM).

5.11 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SEROTONINA EM PACIENTES DIABÉTICOS E DIABÉTICOS DIAGNÓSTICOS COM NEUROPATIA E DEPRESSÃO

A obtenção dos dados utilizados nessa análise seguiram os mesmos critérios do item 6.10, ou seja, os dados foram obtidos através de análises dos prontuários eletrônicos dos pacientes onde se buscou ativamente o diagnóstico, bem como a prescrição afim de confirmação do diagnóstico de neuropatia e depressão associados ao diabetes.

A concentração de serotonina nos pacientes diabéticos diagnosticados com dor neuropática e depressão foi reduzida em relação ao grupo controle, demonstrando a importante relação entre a serotonina e a depressão (Figura 19).

Figura 19 - Dosagem de serotonina em pacientes diabéticos diagnosticados com neuropatia e depressão e pacientes não diabéticos



FONTE: Do autor

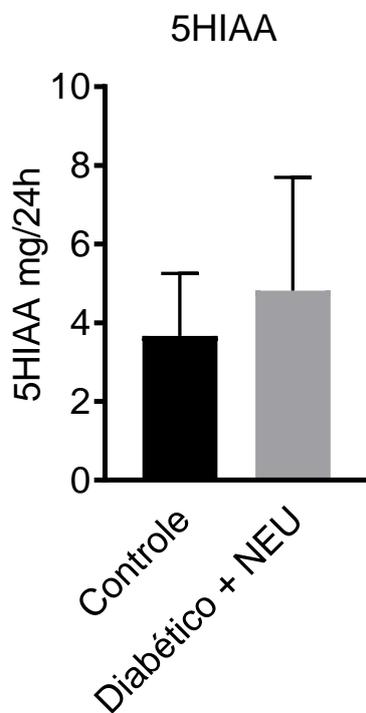
NOTA: A concentração de serotonina foi avaliada por radioimunoensaio em pacientes diabéticos e não diabéticos (controle diabéticos n=11; diabéticos neuropatas e depressivos n=12). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM). * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com pacientes não diabéticos.

5.12 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 5-HIAA EM URINA DE PACIENTES DIABÉTICOS E DIABÉTICOS DIAGNOSTICADOS COM NEUROPATIA

Os dados utilizados nessa análise foram obtidos através de verificação dos prontuários eletrônicos dos pacientes onde se buscou ativamente o diagnóstico de dor neuropática, bem como a prescrição de fármacos utilizados para o controle da dor neuropática.

Na figura 20 foi comparado a concentração de 5-HIAA entre os pacientes diabéticos e os pacientes diabéticos diagnosticados com dor neuropática e verificamos que não houve diferenças estatísticas entre os grupos avaliados.

Figura 20 - Dosagem de 5-HIAA em pacientes diabéticos diagnosticados com dor neuropática e não diabéticos



FONTE: Do autor

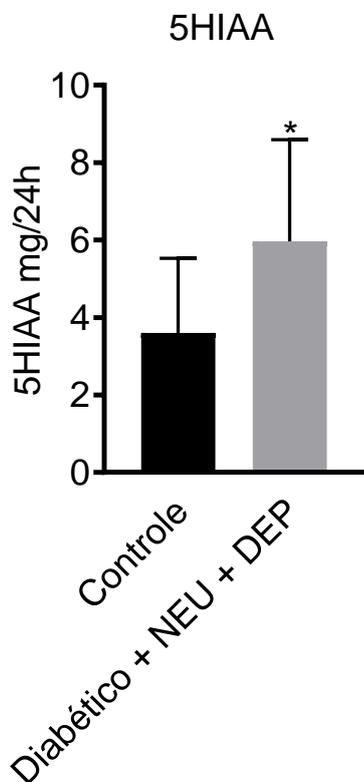
NOTA: A concentração do metabólito 5HIAA foi realizada por HPLC em pacientes diabéticos e não diabéticos (controle diabéticos n=17; diabéticos neuropatas n=12). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM).

5.13 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE 5-HIAA NA URINA DE PACIENTES DIABÉTICOS E DIABÉTICOS DIAGNOSTICADOS COM DOR NEUROPÁTICA E DEPRESSÃO

A obtenção dos resultados apresentados na figura 21 seguiram os mesmos critérios do item 6.12, ou seja, os dados foram obtidos através de análises dos prontuários eletrônicos dos pacientes onde se buscou ativamente o diagnóstico de diabetes e medicamentos utilizados para o tratamento da dor neuropática e , bem como a prescrição afim de confirmação do diagnóstico de neuropatia e depressão associados ao diabetes.

Podemos verificar que a concentração de 5-HIAA na urina de pacientes diabéticos diagnosticados com dor neuropática e com depressão foi significativamente maior do que a nos pacientes diagnosticados apenas com diabetes.

Figura 21 - Dosagem de 5-HIAA em pacientes diabéticos diagnosticados com dor neuropática e depressão



FONTE: Do autor

NOTA: A concentração do metabólito 5HIAA foi realizada por HPLC em pacientes diabéticos e não diabéticos (controle diabéticos n=17; diabéticos neuropatas e depressivos n=11). Os resultados são expressos pela média (\pm EPM). * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com pacientes não diabéticos.

6 DISCUSSÃO

O diabetes *mellitus* (DM) consiste em um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de deficiência na produção de insulina ou na sua ação, ou em ambos os mecanismos, ocasionando complicações em longo prazo. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune, poligênica, decorrente de destruição das células β pancreáticas, ocasionando deficiência completa na produção de insulina (CHIANG *et al.*, 2014).

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) trata-se também de doença poligênica, com forte herança familiar. Entretanto, ainda não é completamente esclarecida, e ainda apresenta fatores ambientais. Dentre eles, hábitos dietéticos e inatividade física que contribuem para a obesidade, destacam-se como os principais fatores de risco. (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2017-2018, 2017).

O desenvolvimento e a manutenção da hiperglicemia ocorrem concomitantemente com hiperglucagonemia, resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina, aumento da produção hepática de glicose, disfunção incretínica, aumento de lipólise e conseqüente aumento de ácidos graxos livres circulantes, aumento da reabsorção renal de glicose e graus variados de deficiência na síntese e na secreção de insulina pela célula β pancreática. (DEFRONZO; LECTURE, 2009). O controle glicêmico tem se mostrado um dos mais importantes alvos clínicos para pessoas com diabetes tipo 2, e o controle glicêmico é fundamental contra o desenvolvimento de complicações agudas e crônicas.

A hiperglicemia é a causa primária da neuropatia diabética clínica e experimental e, mais recentemente foi reconhecido que a deficiência de insulina e de peptídeo C como fatores neurotróficos também pode ter importante papel na patogenia da neuropatia diabética (TOMLINSON; GARDINER, 2008; WAHREN; LARSSON, 2015; XU *et al.*, 2004).

A definição de dor neuropática periférica induzida pelo diabetes proposta pela IASP é “dor que surge como consequência direta de anormalidades no sistema somatossensorial periférico em pessoas com diabetes” (TESFAYE *et al.*, 2010). Pacientes com dor neuropática periférica diabética também apresentam alodinia e

hiperalgesia (LEE *et al.*, 1990). A dor neuropática é uma complicação com alta morbidade e com prognóstico ruim nos indivíduos com diabetes *mellitus* (HOLZER, 1998; JENSEN; CHODROFF; DWORKIN, 2007).

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que diabetes experimental induzida pela administração de aloxana induz comportamento nociceptivo a qual foi revertida pela inibição da enzima IDO1

A enzima IDO-1 metaboliza o aminoácido triptofano a formilquinurenina (LARKIN *et al.*, 2016), que através de metabolizações subsequentes, dá origem a diversos metabólitos biologicamente ativos denominados genericamente de quinureninas (KYN), incluindo os ácidos 3-hidroxiquinurênico, quinurênico, 3-hidroxi-antranílico, antranílico e quinolínico (CHEN; GUILLEMIN, 2009; CARLIN *et al.*, 1989).

Estudos clínicos e pré-clínicos também demonstraram que a ativação excessiva da enzima IDO-1 contribui para a dor induzida por depressão e por inflamação (KIM *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2016).

No paciente com diabetes na depressão há o comprometimento de vários domínios na qualidade de vida, incluindo saúde física, psicológica, relacionamento social, domínio ambiental, dentre outros. (EREN; ERDI; SAHIN, 2008). Além disso, o estresse crônico induz disfunção imunológica diretamente ou por meio da ativação do eixo HPA ou SNS, aumentando a produção de citocinas inflamatórias. Altas quantidades de citocinas inflamatórias interagem com o funcionamento normal das células β pancreáticas, induzem resistência à insulina e, assim, promovem o aparecimento de DM2 (WANG, *et al.*, 2013).

A depressão em pacientes com diabetes vem sendo associada a uma amplificação da sintomatologia, ou seja, aqueles com depressão apresentavam mais sintomas do que os pacientes sem depressão. (CIECHANOWSKI *et al.*, 2003). Um estudo recente sobre a associação entre o uso de antidepressivo e o controle glicêmico mostrou que, em adultos com diabetes o uso de múltiplas subclasses de antidepressivos aumentou significativamente os níveis de HbA1C, sugerindo que o tratamento antidepressivo pode ser um fator de risco para o controle glicêmico (KAMMER *et al.* 2015).

Os primeiros estudos observando maior prevalência de depressão entre doentes com diabetes em comparação com a população saudável foram publicados há mais de 30 anos (ANDERSON *et al.*, 2001).

Ao examinar o efeito do diabetes sobre pacientes deprimidos, um estudo de 2015 com 200.936 pacientes deprimidos mostrou que o DM comórbido pode aumentar o risco de complicações da depressão, como suicídio e hospitalização (KIM *et al.*, 2015).

Outros trabalhos sugerem que a desregulação do eixo HPA (eixo hipotálamo-pituitária-adrenal), a imunidade inata e a inflamação estão envolvidas na etiologia do diabetes tipo 2 e depressão (JOSEPH; GOLDEN, 2017). No entanto, a experiência de um distúrbio crônico como diabetes pode aumentar o risco de depressão, o qual tem um efeito negativo influenciando no autocuidado e adesão ao tratamento dos pacientes diabéticos (PETRAK *et al.*, 2015). Isso significa que a comorbidade entre a depressão e o diabetes pode levar a consequências serias, prejudicando o controle do diabetes (PETRAK; RÖHRIG; ISMAIL, 2018).

Nossos resultados demonstraram que a inibição daIDO-1 apresentou um importante efeito antinociceptivo nos animais com DM. Possivelmente o efeito antinociceptivo do norharmane seja devido ao aumento da disponibilidade de triptofano, levando ao aumento nos níveis de 5-HT de regiões supraespinais, aumentando dessa forma a eficiência da via inibitória descendente da dor. Outro possível mecanismo do norharmane para reduzir a alodinia é a inibição da produção de metabólitos iniciados pela ativação da enzima IDO-1. Esses metabólitos, denominados genericamente de quinureninas, podem induzir a ativação de receptores do tipo NMDA, nesse sentido, o norharmane protege os neurônios da ativação persistente induzida pelo ácido quinolínico, visto que o ácido quinolínico é agonista dos receptores NMDA. Também é conhecido que o ácido quinolínico pode favorecer a ativação da via descendente facilitatória da dor contribuindo para o quadro neuropático, está é outra evidência que suporta os efeitos protetores do norharmane no tratamento da dor neuropática induzida pelo diabetes. (SANTANA, 2015).

Diversas evidências sugerem que a neuropatia diabética também possui influência do sistema imunológico (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010; TALBOT; FOSTER; WOOLF, 2016). A enzima IDO-1 catalisa a etapa limitante da taxa de catabolismo de triptofano induzido por interferon-gama (IFN- γ) (KING; THOMAS, 2007). Foi constatado que citocinas pró-inflamatórias interagem com muitos dos domínios fisiopatológicos que caracterizam a depressão, incluindo metabolismo de neurotransmissores, função neuroendócrina, plasticidade sináptica e comportamento (RAISON, 2006).

Portanto o aumento da síntese de quinurenina via ação imunológica e subsequente liberação de mediadores álgicos como BDNF e citocinas pró-inflamatórias gliais favorecem a formação de mediadores que sensibilizam os nociceptores favorecendo dessa forma a gênese da dor. Existem evidências que demonstraram que o metabolismo excessivo do triptofano desenvolve resistência celular à ação da insulina (LAW; ZHANG, 2017). Também foi demonstrado que a via das quinureninas é alterada em pacientes com diabetes devido à modulação imunológica (GÜRÇÜ *et al.*, 2020).

O teste de campo aberto (*open field*) foi utilizado para analisar a atividade locomotora e também para predizer os parâmetros de ansiedade dos animais (VILELA, 2009). Em um estudo que avaliou a depressão de ratos diabéticos com o teste de campo aberto, verificou-se que os tempos de deslocamentos exploratórios foram significativamente menores no grupo de animais diabéticos com depressão do que naqueles sem depressão (DU *et al.*, 2016). Resultado semelhante também foi obtido em um estudo recente que pretendeu avaliar o efeito dos do sistema renina-angiotensina-aldosterona no alívio de sintomas depressivos de ratos diabéticos (BALOGH, 2020).

Contrário a estes estudos, o nosso resultado não demonstrou influência do diabetes *mellitus* e do tratamento com inibidores daIDO-1 (Norharmane) na imobilidade e na distância percorrida pelos animais. Fato que pode explicar nosso resultado negativo é a utilização dos mesmos animais utilizados para a avaliação da nocicepção mecânica utilizando os filamentos de von Frey, favorecendo dessa forma a indução de estresse nos animais testados e conseqüentemente, a não obtenção dos resultados que corroboram com a literatura.

A dor neuropática, é um dos sintomas mais importantes e incapacitantes da neuropatia e considerando que os medicamentos disponíveis apresentam alguma eficácia contra a dor, mas não impedem a progressão da doença. Dessa forma, busca por novos alvos farmacológicos são desejados para proporcionar melhor qualidade de vida para os pacientes diabéticos neuropáticos.

Em nossa pesquisa com seres humanos, a dosagem laboratorial da glicohemoglobina, hemoglobina glicosilada ou HBA1c foi o primeiro analito a ser dosado, pois reflete reflete os níveis glicêmicos, através da glicose média estimada, dos últimos três meses desses pacientes.

Outro estudo também utilizou a dosagem da hemoglobina glicada (HbA1c) e

demonstrou que HbA1c apresenta papel fundamental na monitorização do controle glicêmico em pacientes diabéticos, pois fornece informações acerca do índice retrospectivo da glicose plasmática. (SACKS *et al.*, 2002). A grande vantagem da HbA1c está no fato de não sofrer grandes flutuações, como na dosagem da glicose plasmática, bem como estar diretamente relacionada ao risco de complicações em pacientes com DM tipos 1 e 2 (DCCT RESEARCH GROUP, 1993). Dessa forma a dosagem de HbA1c foi de fundamental importância para a comprovação dos grupos em relação ao diagnóstico de diabetes e posterior dosagem de serotonina (5-HT) e do metabólito 5-HIAA.

Há mais de sessenta anos, diversos estudos demonstram o efeito da 5-HT e da neurotransmissão serotoninérgica na fisiopatologia da depressão (DELL'OSSO *et al.*, 2016). Os resultados da nossa pesquisa clínica demonstraram uma diminuição na concentração dos níveis de 5-HT nos pacientes diabéticos com neuropatia e depressão. A serotonina é sintetizada a partir do triptofano pela ação da enzima triptofano-5-hidroxilase (SCHROCKSNADEL, 2006). A deficiência de triptofano é a base para o desenvolvimento de transtornos depressivos (CHEN; GUILLEMIN, 2009).

Em 2016 foi demonstrado que alterações no metabolismo do triptofano pela atividade aumentada da enzima daIDO1 aumenta o metabolismo do triptofano, comprometendo assim a síntese de serotonina e favorecendo a formação de quinureninas e a produção de metabólitos neurotóxicos como o ácido 3-hidroxiquinurenina e o ácido quinolínico. (DELL'OSSO *et al.*, 2016). Como mencionado anteriormente, o ácido quinolínico favorece a ativação da via descendente facilitatória da dor e a degradação de triptofano pela enzima IDO-1, consequentemente reduz os níveis de serotonina, diminuindo a eficiência da via descendente inibitória da dor (SANTANA, 2015).

Dentre vários componentes que podem participar do desenvolvimento da dor neuropática, destaca-se o desequilíbrio na via descendente inibitória da dor. Essa via é composta pela substância cinzenta periaquedutal (PAG), o núcleo magno da rafe e as estruturas adjacentes do bulbo formando a bulbo ventromedial rostral (RVM) com suas projeções para o corno dorsal da medula espinal, constituem parte do sistema de controle descendente da dor (VANEGAS *et al.*, 2004). Portanto a redução dos níveis de serotonina em diabéticos pode ser devido às mudanças decorrentes no metabolismo de triptofano ao desviá-lo para a via das quinureninas,

promovendo tanto a depressão, pela redução de 5HT, como a neuropatia pelo aumento da síntese das quinureninas.

Esta hipótese pode ser sustentada por meio de um estudo que demonstrou que o catabolismo do triptofano pela via das quinureninas durante o período crônico da inflamação pode comprometer a disponibilidade deste aminoácido aromático para formar serotonina e, assim, diminuir a quantidade de serotonina importante na modulação descendente inibitória da dor (CAPURON; DANTZER, 2003; Kim *et al.*, 2012). Esta hipótese também é corroborada por outro estudo que postulou que o aumento da atividade da enzima IDO1, importante na via das quinureninas, é inversamente relacionado às concentrações de serotonina no plasma humano (LOOD *et al.*, 2015)

Também demonstramos aumento do metabólito 5-HIAA nos pacientes diabéticos neuropáticos e depressivos, sugerindo uma possível alteração nos níveis basais de serotonina. A principal via de metabolismo da serotonina (5-HT) envolve a desaminação oxidativa pela monoaminoxidase (MAO), com formação de um intermediário acetaldeído; o aldeído é convertido em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por uma enzima ubíqua a aldeído desidrogenase (SUNDERS-BUSH; MAYER, 2006). O ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) é o principal metabólito da serotonina e é excretado na urina. Os tumores carcinóides intestinais e neuroendócrinos, podem produzir quantidades excessivas de 5-HIAA, especialmente em indivíduos com síndrome carcinoide. A síndrome carcinoide é caracterizada por tumores carcinoides, rubor, doença cardíaca e hepatomegalia, dessa forma a medição de 5-HIAA em uma amostra de urina de 24 horas pode diagnosticar doença carcinoide com alta especificidade. (HERDER, 2007).

O uso do ácido 5-hidroxi indolacético como um substituto para medir os níveis de serotonina é importante por causa dos efeitos sistêmicos da serotonina e capacidade prognóstica. A serotonina é secretada principalmente pelas células enterocromafins no sistema gastrointestinal e, em menor extensão, pelos neurônios do sistema nervoso. (JAYAMOHANANAN, 2019). Uma análise precisa da serotonina e seus metabólitos como 5-HIAA sempre foram úteis para auxiliar em diagnósticos na medicina interna, psiquiatria e seus outros efeitos farmacológicos. (NEUROLOGICAL DIAGNOSTIC TESTS AND PROCEDURE FACT SHEET, 2021) Assim podemos sugerir a associação entre o diabetes, a neuropatia e a depressão com a redução da serotonina sérica e aumento do seu metabólito 5-HIAA urinário. É

evidente que a serotonina serve como um biomarcador potencial para muitos distúrbios neurológicos e psiquiátricos, dando assim uma possibilitando dessa forma o futuro desenvolvimento de um biomarcador para favorecer no diagnóstico clínico de pacientes diabéticos com neuropatia e depressão.

6.1 LIMITAÇÕES

A pandemia do coronavírus trouxe uma realidade bastante diferente. Apresentou dificuldades novas, limitações físicas, orçamentárias e estruturais.

Considerando orientações do Comitê Interno para Acompanhamento da Evolução da Pandemia pelo coronavírus da UNIFAL, em relação a pesquisas envolvendo o uso de laboratórios e/ou coleta de dados em trabalhos de campo, que as atividades de pesquisa em laboratórios ou trabalhos de campo somente poderiam ocorrer em projetos em andamento, cuja suspensão acarretaria perda irreversível de experimentos e prejuízo irreparável ao andamento do projeto e ou projetos de pesquisa que estejam direta ou indiretamente relacionados a pandemia de COVID-19, o que não era o nosso caso.

Visto que a primeira etapa do projeto, a experimentação animal, já estava concluída, restando somente a parte de dosagens de analitos e reações de imunohistoquímica, que até o presente momento não puderam ser realizadas em função dos vários decretos governamentais e as orientações institucionais.

Em relação aos experimentos em seres humanos, o agravamento da pandemia, reduziu a participação dos voluntários devido a insegurança e pânico que assolam a todos nesse momento delicado.

Dessa forma, passados mais de doze meses do início da pandemia, encontramos ainda dificuldades quanto ao nosso número de participantes (amostra experimental), visto que a pandemia ainda não apresenta indícios de melhora. Portanto o número experimental utilizado na pesquisa com humanos está inferior ao proposto na pesquisa. Tal fato de justifica devido a impossibilidade de se obter novos participantes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados nos permite concluir que ratos diabéticos tratados com inibidores da enzima IDO-1 apresentaram melhora do quadro de neuropatia experimental quando comparado aos animais controles. Já na pesquisa clínica demonstramos que pacientes diabéticos com diagnóstico de neuropatia e depressão possuíam menores níveis plasmáticos de serotonina e maiores níveis urinários do seu metabólito 5-HIAA. Assim, nosso trabalho nos permite sugerir que alterações no metabolismo do triptofano para a via das quinureninas está relacionado com o *diabetes mellitus*, com a redução da serotonina sérica e sugerindo um aumento na síntese das quinureninas proporcionando dor neuropática induzida pelo diabetes e possivelmente depressão.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, Alenxandria, v.1000, n.1-2, p.40-56, Mar. 2004.
- ANDERSON, R. J. *et al.* The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes. A meta-analysis. **Diabetes Care**, Arlington, v. 24, p.1069–1078, 2001.
- APFEL, S.C. *et al.* Sintomas sensoriais neuropáticos positivos como desfechos em estudos de neuropatia diabética. **Journal of the neurological sciences**, v.189, n.1-2, p. 3-5, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(01\)00584-6](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(01)00584-6)
- ARAÚJO, H.S. *et al.* Treinamento de habilidades sociais no CAPS Madeira Mamoré: Processo de intervenção com um paciente com transtorno de ansiedade. In: III SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE HABILIDADEES SOCIAIS, 2011, Taubaté. Anais[...] Taubaté: UNITAU, 2011, p.61-62.
- AUSTIN P., MOALEM-TAYLOR G. O equilíbrio neuroimune na dor neuropática: envolvimento de células imunes inflamatórias, células gliais semelhantes ao sistema imunológico e citocinas. **J. Neuroimmunol.**v.p. 229 26–250, 2010.
- BALDO, M.V.C. Somestesia. In: AIRES, M.M. *et al.* **Fisiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999.
- BALOGH, D.B. *et al.* Antidepressant effect in diabetes-associated depression: a novel potential of RAAS inhibition. **Psychoneuroendocrinology.**, v.118, 2020. doi: 10.1016/j.psyneuen.2020.104705.
- BELMONTE, C.; CERVERO, F. (EDS.). **Neurobiology of Nociceptors**. Oxford, New York: Oxford University Press, 1996.
- CALLAGHAN, B.C. *et al.* The importance of rare subtypes in diagnosis and treatment of peripheral neuropathy: a review. **JAMA Neurol.** v. 72, p.1510–1518, 2015.
- CARLIN, J.M. *et al.* Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. **J Leukoc Biol**, v.45,p. 29-34, 1989.
- CAPURON, L., DANTZER, R. Cytokines and depression: the need for a new paradigm. **Brain Behav. Immun.** n.17(Suppl. 1), p. 119–124, 2003.
- CAPSAICIN STUDY GROUP. Effect of treatment with capsaicin on daily activities of patients with painful diabetic neuropathy. **Diabetes Care**, v. 15, p.159-165, 1997.
- CHAPMAN, C.R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v.353, n.9171, p.2233-2237, Jun. 1999.
- CHAPLAN, S.R.; MALMBERG, A.B.; YAKSH, L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked

allodynia in the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 280, n.2 p. 829-838, 1997.

CHEN, Y.; GUILLEMIN, G.J. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. **IJTR.**, v.2, p.1–19, 2009.

CHIANG, J.L. *et al.* Type 1 Diabetes Sourcebook Authors. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 237, n.7, p. 2034-2054, jul.2014. doi: 10.2337/dc14-1140. PMID: 24935775; PMCID: PMC5865481.

CIECHANOWSKI, P.S. *et al.* The relationship of depressive symptoms to symptom reporting, self-care and glucose control in diabetes. **Gen Hosp Psychiatry**, v.25, n.4, p. 246-252, 2003.

CRUCCU, G. *et al.* EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 8, p. 1010–1018, ago. 2010.

DANTZER, R. *et al.* Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 426–436, 2011.

DCCT RESEARCH GROUP. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The effect of intensive treatment of Diabetes on the development and progression of the long- term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 329, p. 977- 9 86, 1993.

DEFRONZO, R.A; LECTURE, B. From the triumvirate to the ominous: a new paragigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**. P. 773-795, 2009.

DELL'OSSO, L. *et al.* Depression, Serotonin and Tryptophan. **Curr Pharm Des**. v. 22, n.8, p. 949-954, 2016. doi: 10.2174/1381612822666151214104826. PMID: 26654774.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2017-2018 / Organização José Egídio Paulo de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro Junior, Sérgio Vencio. - São Paulo : Editora Clannad, 2017.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 20, p. 441– 62, jan. 1980.

DU, Q. *et al.* Damages and its mechanism of the blood brain barrier in rats with diabetes mellitus with depression. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**. Jun 8, v. 32, n.6, p.558-562. Chinese, 2016. doi: 10.13459/j.cnki.cjap.2016.06.016. PMID: 29926627.

DYCK, P.J. *et al.* The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester . Neuropathy Study. **Neurology**, v. 43, p. 817–824, 1993.

EREN, I.; ERDI, O.; SAHIN, M. The effect of depression on quality of life of patients

with type II diabetes mellitus. **Depress Anxiety**. v.25, n.2, p.98 -106, 2008.

FALLARINO, F. *et al.* LPS-conditioned dendritic cells confer endotoxin tolerance contingent on tryptophan catabolism. **Immunobiology**, n. 220, v. 2, p. 315-321, 2015.

FELDMAN, E. L. *et al.* New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. **Neuron**, v. 93, n. 6, p. 1296–1313, 22 mar. 2017.

FIELDS, H.L. Can opiates relieve neuropathic pain?. **PAIN**, v.35, n.3, p.365–367, Dec. 1988.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**, 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999. p.309-329.

FRANKLIN, G.M. *et al.* Sensory neuropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. The San Luis Valley Diabetes study. Am. **J. Epidemiol**, v. 131, p. 633–643, 1990.

GABBAY, K.H.; MEROLA, L.O.; FIELD, R.A. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. **Science**, v.151, p.209-10, 1966.

GOODNICK, P.J. Use of antidepressants in treatment of comorbid diabetes mellitus and depression as well as in diabetic neuropathy. **Ann Clin Psychiatry**, v.13, n.1, p.31-41, 2001.

GORDOIS, A. *et al.* The Health Care Costs of Diabetic Peripheral Neuropathy in the U.S. **Diabetes Care**, v. 26, n. 6, p. 1790–1795, 1 jun. 2003.

GUNN, J. *et al.* An analysis of biomarkers in patients with chronic pain. **Pain Physician**, v. 23, p. 41–49, 2020.

GÜRCÜ, S. *et al.* Neopterin and biopterin levels and tryptophan degradation in patients with diabetes. **Sci Rep**. v.10, n. 1, 17025 p. Published 2020 Oct 12., 2020.doi:10.1038/s41598-020-74183-w

GUSTORFF, B. *et al.* Prevalence of self-reported neuropathic pain and impact on quality of life: a prospective representative survey. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v.52, n.1, p.132–136, 2007. doi: 10.1111/j.1399-6576.2007.01486.x.

HERDER W, Biochemistry of neuroendocrine tumours. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** n. 21, v.1, p.33-41, 2007.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen Pharmacol**. v. 30, p. 5–11, 1998. 10.1016/s0306-3623(97)00078-5

HUANG, L. *et al.* Virus infections incite pain hypersensitivity by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. **PLoS Pathog.**, v. 12 2016.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. Global Year Against Neuropathic Pain. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/Advocacy/Content.aspx?ItemNumber=3934>. Acesso em: 30 out. 2018.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>. Acesso em: 27 out. 2018.

JAYAMOCHANANAN H, MANOJ KUMAR MK, T P A. 5-HIAA as a Potential Biological Marker for Neurological and Psychiatric Disorders. **Adv Pharm Bull**. 2019 Aug;v.9, n. 3, p.374-381.

JENSEN, M. P., CHODROFF, M. J., DWORKIN R. H. The impact of neuropathic pain on health-related quality of life: review and implications. **Neurology**. v. 68, p. 1178–1182, 2007. 10.1212/01.wnl.0000259085.61898.9e

JOLIVALT, C. G. *et al*. Phenotyping Peripheral Neuropathy in model of diabetes. **Current protocols in mouse biology**, v. 6, n. 3, p. 223–255, 1 set. 2016.

JOSEPH, J. J.; GOLDEN, S. H. Cortisol dysregulation: The bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 1391, p. 20–34, 2017.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p.203-210, Sep. 2001.

KAI, M.; HAWTHORNE, J.N. Physiological significance of polyphosphoinositoids in the brain. **Ann NY Acad Sci**, v. 165, p.761-773, 1969.

KEHLET, H.; JENSEN, T.S.; WOOLF, C.J. **Dor pós-cirúrgica persistente**: fatores de risco e prevenção. v.376, p.1618-1625, 13 maio 2006.

KAMMER JR, HOSLER AS, LECKMAN- WESTIN E, DIRIENZO G, OSBORN CY. The association between antidepressant use and glycemic control in the Southern Community Cohort Study (SCCS). **J Diabetes Complications**. 2015

KIM GM, WOO JM, JUNG SY, SHIN S, SONG HJ, PARK J, AHN J. Positive association between serious psychiatric outcomes and complications of diabetes mellitus in patients with depressive disorders. **Int J Psychiatry Med**. 2015; n.50, p.131-146.

KIM, H. *et al*. Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. **J. Clin. Invest.**, v.122, p. 2940–2954, 2012. doi: 10.1172/jci.61884.

KING, N.J.; THOMAS, S.R. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, v.39, p.2167–2172. doi: 10.1016/j.biocel.2007.01.004.

KUMAR, A. *et al*. Gray matter prefrontal changes in type 2 diabetes detected using MRI. **J Magn Reson Imaging**, v.27, n.1, p. 14-19, 2008.

LARKIN, P.B. *et al.* Tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 make separate, tissue-specific contributions to basal and inflammation-induced kynurenine pathway metabolism in mice. **Biochim Biophys Acta** v. 1860, p.2345–2354, 2016.

LAUMET, G. *et al.* Upregulation of neuronal kynurenine 3-monooxygenase mediates depression-like behavior in a mouse model of neuropathic pain. **Brain Behav. Immun.** v. 66, p. 94–102, 2017.

LAW, K.P.; ZHANG, H. The pathogenesis and pathophysiology of gestational diabetes mellitus: deductions from a threepart longitudinal metabolomics study in China. **Clin Chim Acta.** v.468, p.60–70, 2017.

LEE, J. H. *et al.* Effect of hyperglycemia on pain threshold in alloxan-diabetic rats: **Pain**, v. 40, n. 1, p. 105–107, jan. 1990.

LERCO, M.M. *et al.* Caracterização de um modelo experimental de Diabetes mellitus, induzido por Aloxana em ratos. Estudo clínico e Laboratorial. **Acta Cir Bras.** v.8, n.2, p.132-142, 2003.

LEVINE, J.D.; TAIWO, Y. - Inflammatory Pain. In: WALL, P.D.; MELZACK, R; BONICA, J.J. **Textbook of Pain**. 3. ed. Edinburgh: Scotland, Churchill Livingstone, 1994, p.45-56.

LYNN ANG, L. *et al.*. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. **American diabetes association**, 2018.

LINDSAY, T. J. *et al.* Treating Diabetic Peripheral Neuropathic Pain. **American Family Physician**, v. 82, n. 2, p. 151–158, 15 jul. 2010.

LOEWENSTEIN, W.R. Mechano-Electric Transduction in the Pacinian Corpuscle: Initiation of Sensory Impulses in Mechanoreceptors. em Autrum H. **Handbook of Sensory Physiology**. Berlin. Springer-Verlag, 1971; p.267-290.

LOOD, C. *et al.* **Type I interferon-mediated skewing of the serotonin synthesis is associated with severe disease in systemic lupus erythematosus**, 2015.

MAZZANTI, M.C. *et al.* Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural.** v.33, p.1061-1065, 2003.

MCQUAY, H.J. *et al.* A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. **Pain**, v.68, p. 217-227, 1996.

MCNEELY, M.J. *et al.* The independent contributions of diabetic neuropathy and vasculopathy in foot ulcerations. How great are the risks? **Diabetes Care**, v.18, p. 216-219, 1995.

- MESCI N., MESCI E., KÜLCÜ D. G. Association of neuropathic pain with ultrasonographic measurements of femoral cartilage thickness and clinical parameters in patients with knee osteoarthritis. **Journal of Physical Therapy Science**, v.28, n.8, p.2190–2195, 2016.. doi: 10.1589/jpts.28.2190.
- MERSKEY, H. History and definition of chronic pain. In: Rashiq S, Schopflocher D, Taenzer P, Jonsson E, editors. Chronic pain: a health policy perspective. **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, pp. 19–28, 2008.
- MEZRICH, JD. *et al.* An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor cangenerate regulatory T cells. **J Immunol**, v. 18, p.6, p. 3190-3198, 2010.
- NEUROLOGICAL diagnostic tests and procedure fact sheet. Available from: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/NeurologicalDiagnostic-Tests-and-Procedures-Fact>. Acesso em 25 maio 2021.
- PETRAK, F.*et al.* Depression and diabetes: Treatment and health- care delivery. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, n. 3, p. 472–485, 2015.
- PETRAK, F., RÖHRIG, B., ISMAIL, K. Depression and diabetes.. In: GROOT,L.J. *et al.*, (Eds.) **Endotext**. Available from: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK498652/>), 2018. Acesso em 10/06/2020
- PINTO, H. M.; CARVALHO, A. R.; SÁ, E. N. Os estilos educativos parentais e a regulação emocional: Estratégias de regulação e elaboração emocional das crianças em idade escolar. **Análise Psicológica**, v. 32, n. 4, p. 387-400, 2014.doi: 1014417/ap.32.3.844
- POP-BUSUI, R. *et al.* Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 40, p.136–154, 2017.
- RAISON CL, CAPURON L, MILLER AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol**, v.27, p. 24-31, 2006.
- RAJASEKARAN, S.; KANNA, R. M.; SHETTY, A. P. Management of thoracolumbar spine trauma: An overview. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 49, n. 1, p. 72–82, 2015.
- ROBINSON,C.M.; SHIREY,K.A.; CARLIN,J.M. Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **J. Interferon Cytokine Res.** n. 23, p.413-421, 2003.
- ROCHA, .A.P.C. *et al.* Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization, **Revista Brasileira de Anestesiologia**, n. 1, Janeiro-Fevereiro, 2007
- RYABOV, G. G.; SEROV, V. A. On Classification of k-Dimension Paths in n-Cube. **Applied Mathematics**, v. 05, n. 04, p. 723–727, 2014.
- ROJEWUSKA, M. *et al.* Epidemiology of multimorbidity within the Brazilian adult

general population: evidence from the 2013 **National Health Survey (PNS 2013)**. *PLoS One*. v.12,n. 2, 2017.

SANDERS-BUSH, E. MAYER, S.E. Agonistas e antagonistas dos receptores de 5-hidroxitriptamina (serotonina) In:Goodman e Gilman **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11 ed. Mcgraw-hill, New York, cap. 11, p. 265-282, 2006.

SANTANA, D. A. R. **Ativação supraespinal da via das quinureninas contribui para a manutenção da dor neuropática**. 2015. 157 p .Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

SACKS, D. B. *et al.* Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem**, v. 48, p. 436-472, 2002.

SCHROCKSNADEL, K. *et al.* Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. **Clin. Chim. Acta**, v.364,p. 82–90, 2006. doi: 10.1016/j.cca.2005.06.013.

STONE, T.W.; PERKINS, M.N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. **Eur J Pharmacol**, n. 72, p.411-412, 1981.

TABAK, A. G. T, *et al.* Depression and type 2 diabetes: A causal association? **The Lancet Diabetes Endocrinology**, n. 2, v.3, p. 236–245, 2014.

TALBOT, S.; FOSTER, S. L.; WOOLF, C. J.. Neuroimmunity: physiology and pathology. **Annu. Rev. Immunol.** v. 34, p. 421–447, 2016. 10.1146/annurev-immunol-041015-055340.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **JBA**, v. 1, n. 4, p. 329-334, 2001.

TESFAYE S. *et al.* Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. **Diabetes Care**. V.33, n.10, p 2285-2293, 2010.

TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 28 Suppl 1, p. 8–14, fev. 2012.

TOMLINSON DR, FERNYHOUGH P, DIEMEL LT. Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors. **Diabetes**, n.46(suppl2), p.43-49, 1997.

TOMLINSON, D. R.; GARDINER, N. J. Glucose neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 36–45, 1 jan. 2008.

TREEDE,R.D. Definição de dor da Associação Internacional para o Estudo da Dor: tão válida em 2018 quanto em 1979, mas precisa de notas de rodapé atualizadas regularmente. **Dor Rep.**, v.3, n.2, 2018.

TRUINI, A.; GARCIA-LARREA, L.; CRUCCU, G. Reappraising neuropathic pain in humans—how symptoms help disclose mechanisms. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 10, p. 572–582, out. 2013.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**, v.83, p.103-111, 1970.

VANEGAS, H., SCHAIBLE, H. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?. **Brain Res Rev**, v. 46, p. 295-309, 2004.

VILELA, F. C. **Efeito antinociceptivo, ansiolítico e antidepressivo dos extratos das partes aéreas de *Sonchus oleraceus*** / Fabiana Cardoso Vilela. - Alfenas, 2008. 98 f. : il. - Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2008.

WAHREN, J.; LARSSON, C. C-peptide: New findings and therapeutic possibilities. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 107, n. 3, p. 309–319, 1 mar. 2015.

WALKER, A. *et al.* Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. **Pharmacol. Rev.** v. 66, p. 80–101, 2014.

WANG, J.H. *et al.* (2006). Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 31, 22021-22028.

WANG X, *et al.* Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Care**. 2013; 36:166-175.

WEBSTER, K.E. Somaesthetic pathways. **BR MED BULL**, v. 33, p.113-120, 1977.

XU, X.J.; WIESENFELD-HALLIN, Z. **Novel Modulators in Nociception**. [s.l: s.n.]. v. 130, 1997.

ZHOU, W..*et al.* Peripheral indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is required for comorbid depression-like behavior but does not contribute to neuropathic pain in mice. **Brain Behav. Immun.** v.46, p.147–153, 2015.

YACYAHISHI *et al.* Peripheral neuropathy in the WBN/Kob rat with chronic pancreatitis and spontaneous diabetes. **Lab Invest**, v. 63, p. 296-307, 1993.

ANEXO – APROVAÇÃO CEUA

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Investigação das implicações fisiopatológicas da via das quinureninas na dor neuropática diabética**, registrada com o nº **0008/2019**, sob a responsabilidade de **Fabiana Cardoso Vilela**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/02/2020 a 20/02/2022**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Wistar	32	32	0	Biotério central

Alfenas, 09 de Abril de 2021

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Ativar o Windows

Acesse Configurações para ativar o Windows.

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 15f502c03e4030365c1007584555c977