



**AUGUSTO MUZILLI JUNIOR**

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE NEUROPATIA  
DIABÉTICA EM RATOS E A RELAÇÃO DA EXPRESSÃO  
DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNOQUINASE C (PKC) NESTE  
PROCESSO**

**PIRACICABA  
2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**AUGUSTO MUZILLI JUNIOR**

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE NEUROPATIA  
DIABÉTICA NA ATM DE RATOS E RELAÇÃO DA EXPRESSÃO  
DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNOQUINASE C (PKC) NESTE  
PROCESSO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia,  
da Universidade Estadual de Campinas,  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção  
do Título de Mestre em Odontologia, na área de  
Fisiologia Oral.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Trindade Clemente Napimoga

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida  
por Augusto Muzilli Junior, orientado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana  
Trindade Clemente Napimoga.

---

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA  
2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba Marilene  
Girello - CRB 8/6159

- M988a Muzilli Junior, Augusto, 1952-  
Avaliação do desenvolvimento de neuropatia diabética na ATM de ratos e a relação da expressão das isoformas da proteinoquinase C (PKC) neste processo / Augusto Muzilli Junior. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.
- Orientador: Juliana Trindade Clemente Napimoga.  
Coorientador: Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
1. Diabetes Mellitus experimental. 2. Neuropatias diabéticas. 3. Dor facial. 4. Articulação temporomandibular. I. Clemente-Napimoga, Juliana Trindade, 1978-. II. Fusaro, Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of the development of diabetic neuropathy in TMJ of rats and the relationship of the expression of the isoforms of protein kinase C (PKC) in this process

**Palavras-chave em inglês:**

Diabetes Mellitus, experimental

Diabetic neuropathies

Facial pain

Temporomandibular joint

**Área de concentração:** Fisiologia Oral

**Titulação:** Mestre em Odontologia

**Banca examinadora:**

Juliana Trindade Clemente Napimoga [Orientador]

Elizabeth Ferreira Martinez

Antonio Wilson Sallum

**Data de defesa:** 25-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa de Dissertação e Tese da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, reunida em 25 de Fevereiro de 2014, considerou o candidato AUGUSTO MUZILLI JUNIOR apto para:

Prof. Dr. JULIANA APÉCIEMENTE NAPMOGA

Prof. Dra. ELIZABETH FERREIRA MARTINEZ

Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM



## RESUMO

A doença diabetes em sua fase inicial é conhecida por induzir dor neuropática, como resultado de complicações neurovasculares mediada pela via diacilglicerol/Proteína quinase C (DAG/PKC). Considerando que a neuropatia induzida pelo diabetes está associada com diferentes isoformas da PKC, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de diferentes isoformas da PKC nas condições dolorosas induzidas pelo diabetes tipo 1 na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. Ratos Wistar ( $\pm 150$ g, 2 meses de idade,  $n=4-6$ /grupo) foram tratados com uma injeção intraperitoneal de tampão citrato (veículo; normoglicêmicos-NG) ou Estreptozotocina 75mg/kg (diabéticos-DB). As alterações dolorosas induzidas pelo diabetes tipo 1 foram avaliadas através da mensuração do comportamento nociceptivo dos animais induzido por uma injeção intra-articular de formalina 1,5% ou capsaicina 1,5% nos dias 7, 14, 21, 28, 35 ou 42 dias após a indução do diabetes ou veículo. Após a avaliação dos comportamentos nociceptivos, os animais foram mortos por anestesia e o tecido periarticular removido para análise de Western Blot. A fase inicial do diabetes tipo 1 induziu uma hiponocicepção na ATM dos ratos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias depois da indução do diabetes ( $p < 0.05$ : Two-way ANOVA, Bonferroni's test). Os animais diabéticos tratados com uma injeção intra-articular de capsaicina demonstraram hiponocicepção 7, 14, 21 e 28 dias depois da indução do diabetes ( $p < 0.05$ : Two-way ANOVA, Bonferroni's test). A análise por Western Blot demonstrou que a expressão das proteínas quinases PKC- $\beta 1$ , PKC- $\beta 2$ , PKC- $\delta$  e PKC- $\epsilon$  no tecido periarticular foi significativamente maior nos ratos DB em comparação aos animais NG ( $p < 0.05$ : Two-way ANOVA, Bonferroni's test), enquanto a expressão da PKC- $\alpha$  no tecido periarticular foi significativamente menor nos ratos DB em comparação aos animais NG ( $p < 0,05$ ). Os resultados sugerem que a hiponocicepção induzida pelo diabetes na ATM de ratos está associada à variação da expressão das diferentes isoformas da PKC: - $\alpha$ , - $\beta 1$ , - $\beta 2$ , - $\delta$  e - $\epsilon$ .

**Palavras-chaves:** Diabetes Mellitus Experimental; Neuropatias Diabéticas, Dor Facial, Articulação Temporomandibular, Proteína quinase C.





## ABSTRACT

Diabetes in early phase is known to result in painful neuropathy as a result of neurovascular complications mediated by the activation of Diacylglycerol/Protein kinase C pathway (DAG/PKC). Considering that diabetes-induced neuropathy is associated with different PKC isoforms, the aim of this study was to evaluate the expression of PKC in diabetes type 1-induced pain condition in the temporomandibular joint (TMJ) of rats. Wistar rats ( $\pm 150$  g, 2-month-old,  $n=4-6$ /group) were treated with an intraperitoneal injection of citrate buffer (vehicle; normoglycemic-NG) or Streptozotocin 75 mg/kg (diabetic-DB). Diabetes-induced pain conditions were assessed by the animals' nociceptive behavior induced by an intra-articular injection of 1.5% formalin or 1.5% capsaicin 7, 14, 21, 28, 35 or 42 days after the diabetic induction or vehicle. After behavioral assays, animals were terminally anesthetized and their periarticular tissue removed for Western Blot analysis. Early phase of diabetes type 1 induced hyponociception into TMJ of rats 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days after the diabetic induction ( $p < 0.05$ : Two-way ANOVA, Bonferroni's test). DB animal treated with an intra-articular injection of capsaicin demonstrated hyponociception 7, 14, 21 and 28 days after diabetes induction ( $p < 0.05$ : Two-way ANOVA, Bonferroni's test). Western Blot analysis demonstrated that the expression of PKC- $\beta 1$ , PKC- $\beta 2$ , PKC- $\delta$  and PKC- $\epsilon$  in periarticular tissue was significantly higher in the DB rats than in the NG rats ( $p < 0.05$ : Two-way ANOVA, Bonferroni's test), whereas the expression of PKC- $\alpha$  in periarticular tissue was significantly higher in the DB rats than in the NG rats ( $p < 0.05$ ). Early phase of diabetes type 1 induce hyponociception in rats TMJ that involves changes in the expression of different kinds of PKC isoforms:  $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$ .

**Key Words:** Diabetes Mellitus, Experimental; Diabetic Neuropathies, Facial Pain, Temporomandibular Joint, Protein kinase C.



## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>xiii</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
<b>3. PROPOSIÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>10</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>14</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>21</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>27</b>
<b>ANEXO I:</b> Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA/UNICAMP.	<b>33</b>



## DEDICATÓRIA

A Deus por tudo que sou;

Aos meus pais Augusto e Cleide pelo amor dedicado e exemplo de retidão;

Aos meus filhos Tatiana, Tiago, Christina, Marina e Augustinho; e ao meu neto João Pedro, o meu eterno amor por vocês;

Aos meus irmãos Oscar, Carlos Alberto e Marcelo pela amizade fraterna e incentivo;

Ao grande amor da minha vida Cely, o meu eterno agradecimento pela dedicação, compreensão e apoio incondicional.



## **AGRADECIMENTOS**

### **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À minha orientadora Prof. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga, pela sabedoria, orientação, dedicação e empenho, meu eterno agradecimento;

Às colegas e amigas Cristina Gomes de Macedo e Fabiana Furtado Freitas pela ajuda, dedicação, carinho e tudo que me ensinaram, meu muito obrigado;

À Prof. Dra. Fernanda Klein Marcondes pelos ensinamentos e pelo apoio dado;

Ao Prof. Dr. Antonio Wilson Sallumpela pela amizade fraterna e pelo apoio incondicional para que ingressasse na FOP-UNICAMP;

Aos funcionários e amigos Carlos Alberto A. Feliciano, Eliete Righetto e Maria Elizados Santos por tudo que fizeram e fazem por mim e pelos alunos de modo geral;

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas;

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade oferecida;

Aos Professores do Departamento de Fisiologia pelos ensinamentos ministrados e pelo apoio à pesquisa;

A todos os amigos e alunos da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pelo apoio mútuo e coleguismo **ético** demonstrado;

Ao Prof. Dr. Lourenço Sobrinho pela amizade e incentivo constante;

Ao Prof. Dr. Enilson Sallum pelo apoio e carinho;

A todos os Professores que de forma direta ou indireta contribuíram para o nosso melhor aproveitamento;

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pelo profissionalismo demonstrado e dedicação prestada;

A algum amigo que por ventura não tenha sido citado, mas que colaborou com seu incentivo e dedicação.



## EPÍGRAFE

*"Quando alguém deixa de aprender, deixa de escutar, deixa de ver e de fazer perguntas  
novas, então é tempo de morrer."*

Santiago Ramón Y Cajal

## 1. INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma doença metabólica onde a principal característica clínica é o aumento anormal da glicemia acompanhado de sintomas clínicos característicos como a poliúria, a polifagia e a polidipsia.

Atualmente é uma das mais frequentes doenças da humanidade, e as mudanças no comportamento e estilo de vida dos seres humanos no último século, tem resultado em um dramático aumento na incidência da doença no mundo (Zimmet *et al.*, 2001). Segundo a Federação Internacional do Diabetes, 285 milhões de pessoas no mundo tem a doença e estima-se que para o ano de 2030 este número chegue a 438 milhões de pessoas. São dados alarmantes tendo em vista que as complicações da doença causam um alto índice de morbidade e mortalidade (Lin *et al.*, 2014).

Em 1997, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Associação Americana de Diabetes (ADA) definiram a nova classificação da doença, baseado em aspectos bioquímicos e clínicos:

- diabetes mellitus tipo I (insulinopênico)
- diabetes mellitus tipo II (resistência à insulina ou insulinopenia relativa)
- outros tipos específicos de diabetes mellitus
- diabetes mellitus gestacional

Apesar do Diabetes, especialmente Tipo I e II, apresentarem etiologias diferentes, compartilham sinais e sintomas comuns, como por exemplo, intolerância à glicose, hiperglicemia e hiperlipidemia. As duas formas de apresentação desta doença apresentam complicações similares, dentre elas as anormalidades vasculares e as neuropatias (Singleton *et al.*, 2003; Daulhac *et al.*, 2006).

Especificamente em relação às neuropatias periféricas sensoriais induzidas pelo diabetes, estas representam complicações debilitantes afetando mais de 50% dos pacientes diabéticos (Boulton *et al.*, 2004). São descritas como distúrbios no sistema nervoso periférico, ocasionados por alterações estruturais nas fibras neuronais – como rompimento da célula de Schwann (desmielinização), degeneração e perda axonal; lesões microvasculares e alterações nas sinalizações bioquímicas intracelulares (Arezzo and

Zotova, 2002). Estas neuropatias induzem uma variedade de alterações na condução nervosa incluindo dores espontâneas, hiperalgesia e alodínea, assim como quadros de hipoalgesia e analgesia (Calcutt, 2004).

Neste sentido, estudos em humanos tem sugerido que as alterações sensoriais decorrentes do diabetes também estão relacionadas com distúrbios do sistema estomatognático, tais como perda precoce de elementos dentais, disfunções temporomandibulares, dor orofacial, síndrome da ardência bucal e periodontite (Collin *et al.*, 2000; Arap *et al.*, 2010; Zhu and Nilolajczyk, 2014). No entanto, apesar de bem estabelecido pela literatura, as consequências decorrentes da neuropatia periférica induzida pelo diabetes, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o início e manutenção destas neuropatias ainda são pouco compreendidos (Daulha *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007).

A literatura tem sugerido que um provável mecanismo para o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica seja através da ativação da via Diacilglicerol/Proteína quinase C (DAG/PKC) (Evcimen and King, 2007). A PKC é um grupo de enzimas membros da família de proteínas quinases dependentes do AMPc, que apresentam múltiplas funções celulares e se afetam múltiplas vias de sinalização celular, o que pode contribuir para o desenvolvimento das neuropatias induzidas pelo diabetes (Gerald and King, 2011).

Considerando que a neuropatia periférica induzida pelo diabetes pode estar relacionada com o fator de risco para o desenvolvimento de uma disfunção temporomandibular severa, o presente estudo teve como proposta avaliar as alterações sensoriais induzidas pelo diabetes na ATM de ratos e sua relação com a expressão de diferentes isoformas da PKC.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

*“O diabetes é uma aflição horrorosa, não muito frequente entre os homens, em que as carnes, os braços e as pernas se derretem e murina. Os doentes nunca param de urinar, e o fluxo é incessante como a abertura de uma queda. A vida é pequena, desagradável e dolorosa.”* (Areteus da Capadócia-século II d.C.).

O Diabetes (*do grego: sífilis*), assim denominado por Areteus devido a exagerada eliminação de água pelos rins, é uma doença metabólica onde a principal característica clínica é o aumento anormal da glicemia acompanhado de sintomas clínicos característicos como a poliúria, a polifagia e a polidipsia. Os sinais clínicos relacionados com o diabetes e mesmo algumas de suas complicações são conhecidos desde tempos mais remotos: O papiro de Ebers (1500 a.C.) já descrevia o tratamento da poliúria, referindo que a urina tinha gosto doce; Galeno considerava a doença como uma fraqueza dos rins; e os japoneses e chineses no século II a.C. já chamavam de “doença da sede” (Thomaz, 1977).

William Cullen, no século XVIII, acrescentou o adjetivo *mellitus* ao termo *diabetes* para diferenciá-lo da diabetes insipida, que pode ser causada pela deficiência na produção, na secreção ou na ação do hormônio antidiurético e não apresenta hiperglicemia. E partindo desta época, surgiram os estudos descrevendo teorias sobre a etiologia e mecanismos envolvidos com o desenvolvimento da doença, no intuito de desenvolver tratamentos.

Em 1869, o alemão Paul Langherans descreve que o pâncreas é constituído de inúmeras ilhas, posteriormente sendo denominadas de Ilhotas de Langherans. A degeneração das Ilhotas de Langherans foi correlacionada com o diabetes por Oppie em 1900, cuja função endócrina foi reconhecida. Em 1907, Lane, pela primeira vez, fez a distinção entre as células alfa e beta pancreáticas. Em Toronto, Banting em colaboração com Best (1921), descobriu e isolou a insulina (*dolatim: que vem das ilhas*), determinando um marco culminante na história da doença. No ano seguinte, em janeiro de 1922, foi aplicada, pela primeira vez, a insulina no homem que passou a ser regularmente usada a partir de 1924, trazendo profunda modificação na evolução dos diabéticos, melhorando a

expectativa de vida (Thomaz, 1977). No entanto, o tratamento com dieta, hipoglicemiantes e reposição de insulina não fez declinar significativamente as manifestações das doenças vasculares na população diabética (Thomaz, 1977).

Apesar do diabetes tipos I e II apresentarem etiologias diferentes, compartilham sintomas comuns e as duas formas de apresentação da doença apresentam complicações similares, divididas em agudas e crônicas.

As complicações agudas são representadas principalmente pelo quadro de cetoacidose ou pelo coma hiperosmolar, a desidratação e as diferentes infecções em diversas localizações, sendo o pé diabético uma das mais preocupantes. Já as complicações crônicas são representadas pelo depósito de gordura na parede arterial, a retinopatia diabética, a insuficiência renal progressiva, além de alterações metabólicas com destaque para as anormalidades vasculares e as neuropatias (Singleton *et al.*, 2003; Daulha *et al.*, 2006).

O desenvolvimento das neuropatias periféricas sensoriais induzidas pelo diabetes está diretamente associado com a falta do controle glicêmico, tempo de instalação da doença, fatores microvasculares (microangiopatias) e fatores de risco cardiovasculares (hipertensão, hiperlipidemia, obesidade e fumo) (Tesfaye *et al.*, 1996; Boulton *et al.*, 2004; Tesfaye and Selvarajah, 2012). Estas neuropatias induzem uma variedade de alterações na condução nervosa incluindo dores espontâneas, hiperalgesia e alodínea, assim como quadros de hipoalgesia e analgesia (Calcutt, 2004).

Neste sentido, estudos clínicos têm demonstrado que a principal queixa de pacientes diabéticos é, frequentemente, a perda da sensibilidade nas extremidades (hipoalgesia), que em estágios avançados pode evoluir para completa analgesia (ausência da sensibilidade dos nervos periféricos), facilitando a ocorrência de acidentes que acarretam em danos teciduais e quadros infecciosos, podendo levar, em casos mais graves, à amputação do membro afetado (Calcutt, 2004).

Apesar da literatura escassa, estudos em humanos tem sugerido que as alterações decorrentes do diabetes também estão relacionadas com distúrbios do sistema estomatognático, tais como perda precoce de elementos dentais, disfunções temporomandibulares, dor orofacial, síndrome da ardência bucal e periodontite (Collinet

*al.*, 2000; Arap *et al.*, 2010; Zhu and Nilolajczyk, 2014). Em particular, uma neuropatia periférica induzida pelo diabetes está relacionada com o fator de risco para o desenvolvimento de disfunção temporomandibular severa. Considerando que pacientes com neuropatia diabética também desenvolvem quadros de hipoalgesia, tem sido sugerido que a perda de sensibilidade na articulação temporomandibular (ATM) pode induzir a desordens articulares e deformidades como, por exemplo, as articulações de Charcot (Collin *et al.*, 2000). A articulação de Charcot, uma neuroartrite, é consequência da lesão dos nervos, como no caso da neuropatia induzida pelo diabetes, que impede a percepção da dor articular acarretando em lesões e fraturas insignificantes e repetidas (de forma despercebida) até a deterioração permanente da articulação (Rogers *et al.*, 2011).

Apesar de bem demonstrado pela literatura as complicações envolvidas com a neuropatia periférica induzida pelo diabetes, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos como início e manutenção destas neuropatias ainda são pouco compreendidos (Daulhac *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007).

Muitas informações quanto à teoria das neuropatias diabéticas têm sido publicadas nos últimos anos, porém é bastante improvável que haja apenas uma causa envolvida neste processo, mas sim uma associação de diferentes anormalidades, culminando em um quadro clínico comum de neuropatia (Tsfaye *et al.*, 2010). Neste sentido, a literatura sugere uma relação direta entre o estado hiperglicêmico, mantido cronicamente, e as complicações micro e macrovasculares, suportando a hipótese de que a hiperglicemia é o fator determinante na gênese das complicações do diabetes (Boulton *et al.*, 2005).

Assim, tem sido hipotetizados mecanismos bioquímicos envolvidos nas anormalidades estruturais e funcionais relacionadas à exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia, tais como formação de produtos da glicação não enzimática, aumento da atividade aldose-redutase, alteração dos radicais livres e ativação da Proteína quinase C (PKC) através da via do Diacilglicerol (Forbes *et al.*, 2005).

A glicose presente no compartimento extracelular é transportada para o compartimento intracelular por difusão, por ação de transportadores de glicose. Esta glicose intracelular é metabolizada por glicólise. Mesmo em condição de hiperglicemia,

uma pequena parte da glicose intracelular é metabolizada pela via aldose-redutase, o que resultaria em umaumentodaviadosorbitolcomalteraçãodasviasdetransduçãode sinais,comoporexemplo,aviaDiacilglicerol/ProteinoquinaseC(DAG/PKC)(Idris *et al.*, 2001).

O DAG pode ser derivado da hidrólise de fosfatidil-inosídeos, pelo metabolismo da fosfatidilcolina por ação da fosfolipase C; ou pela síntese "denovo" através dos intermediários glicolíticos (com aumento do sorbitol), fosfato de diidroxiacetona e gliceral-3-fosfato; com subsequente ativação da PKC (Evcimen and King, 2007). A via DAG/PKC também pode ser ativada pela hiperglicemia como resultado do aumento do estresse oxidativo, com oporexemplo, pelo aumento de peróxido de hidrogênio, o qual é um conhecido ativador da PKC, seja de forma direta ou indireta pelo aumento da produção do DAG. (Konishi *et al.*, 1997; Nishikawa *et al.*, 2000). A PKC é um grupo de proteínas, membro da família de proteoquinases dependentes do AMPc, que apresenta múltiplas funções celulares e afeta muitas vias de transdução de sinais (Gerald e King, 2010).

O DAG é o principal ativador fisiológico da PKC. O aumento dos níveis de DAG no diabetes pode ocorrer através de múltiplas vias (Evcimen and King, 2007) e sua ativação está diretamente relacionada com a hiperglicemia dos pacientes diabéticos e desenvolvimento das alterações neurovasculares (Evcimen and King, 2007).

Um dos mecanismos fisiológicos importantes na regulação de proteínas intracelulares é o adicionar ou remover grupos fosfatos, tornando essas proteínas em enzimas, receptores ou segundo-mensageiros. Uma série de respostas celulares mediadas por receptores e pelas vias metabólicas pode ser ativada ou desativada por quinases (com adição de grupo fosfato) intracelulares. A PKC é uma das três principais quinases de serina-treonina (são aquelas que fosforilam proteínas em resíduos de serina e treonina) estando envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento (Gerald e King, 2010).

A família da PKC apresenta pelo menos 12 isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$ ), classificadas em: (1) Convencionais ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ) que são cálcio-dependentes ativadas pela fosfatidil-serina e pelo DAG; (2) Originais ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  e  $\eta$ ) que são cálcio-

independentes, reguladas pelo DAG e fosfatidil-serina); e (3) Atípicas ( $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\lambda$ ) que são cálcio-independentes não requerem DAG para ativação (Whiteside and Dlugosz, 2002; Gerald and King, 2010).

Um mecanismo pelo qual a PKC contribui para o desenvolvimento da neuropatia diabética ainda não está esclarecido, no entanto, tem sido demonstrado que algumas isoformas da PKC contribuem para o desenvolvimento das neuropatias induzidas pelo diabetes interferindo em mecanismos neurovasculares tais como o fluxo sanguíneo e velocidade de condução nervosa (Gerald and King, 2010).

Neste sentido, estudos imunohistoquímicos demonstraram a presença das isoformas PKC- $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$ , - $\epsilon$  e - $\delta$  em tecidos neurais (Kim *et al.*, 1991; Borghini *et al.*, 1994).

A PKC- $\alpha$  é uma das isoformas menos estudadas, apesar de estudos terem demonstrado sua presença em tecidos neuronais (Evcimen and King, 2007), existe uma escassez de estudos demonstrando seu papel em alterações neurovasculares. Em tecido cardíaco, apesar de estudos iniciais sugerirem que a PKC- $\alpha$  tenha um importante papel para estimular a hipertrofia deste tecido, pesquisas em ratos, suportam a teoria de PKC- $\alpha$  no tecido cardíaco tem um papel regulador da contratilidade do tecido e a indução de hipertrofias (Evcimen and King, 2007).

A PKC- $\beta$  está envolvida em várias funções celulares diferentes, tais como a ativação de células B, a indução de apoptose, proliferação de células endoteliais, e a absorção intestinal de açúcares. Tem sido a isoforma mais estudada em relação à neuropatia. Estudos mostram que a utilização de inibidores de PKC- $\beta$  em casos de animais diabéticos induzidos por streptozotocina aumentou o fluxo sanguíneo no nervo ciático bem como sua velocidade de condução, sugerindo que a microcirculação e a isquemia estejam envolvidas na neuropatia diabética, bem como a ativação desta isoforma da PKC (Sasase *et al.*, 2004).

A PKC- $\delta$  é bastante expressa no cérebro, medula e neurônios. Tem sido demonstrado que a PKC- $\delta$  está relacionada a várias funções neuronais tais como a potenciação de longo prazo (LTP) e depressão a longo termo (LTD). Tem sido demonstrado que o aumento da expressão da PKC- $\delta$  está envolvido como o aumento da apoptose de células vasculares em retinopatia diabética, com sensível piora e



irreversibilidade do quadro, mesmo após o controle da glicemia e diminuição da expressão do DAG (Gerald e King, 2010).

A PKC- $\epsilon$  tem sido bem estudada por estar envolvida em várias funções celulares diferentes, tais como a apoptose, a cardioproteção na isquemia, o choque térmico e a resposta, liberação de insulina e desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória. Neste contexto, sabe-se que as injúrias teciduais e o processo inflamatório decorrente estão associados à síntese de prostanoídes que sensibilizam neurônios sensitivos primários resultando em hiperalgesia através da ativação da PKC- $\epsilon$  (Sachs *et al*, 2009).

Em suma, considerando que a alteração da sensibilidade induzida pelo diabetes no sistema trigeminal pode ocasionar lesões severas na ATM, este estudo tem como proposta avaliar as condições dolorosas induzidas pelo diabetes na ATM de ratos e associá-las à variação da expressão das isoformas da PKC- $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$ , - $\epsilon$  e - $\delta$  no tecido periarticular.

Considerando que mudanças no comportamento e estilo de vida dos seres humanos, como sedentarismo e obesidade, no último século, têm resultado em um dramático aumento na incidência do diabetes no mundo (Zimmet *et al*, 2001), tratando-se de um crescente problema de saúde pública, sendo responsável por um alto índice de morbidade e mortalidade (Libman *et al*, 1993; Lin *et al*, 2014), o desenvolvimento do trabalho proposto é de relevância clínica uma vez que auxilia no melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos nas alterações da sensibilidade somática na ATM pelo diabetes e consequente possibilidade de lesões e deterioração da articulação.

### 3. PROPOSIÇÃO

Considerando que a neuropatia periférica induzida pelo diabetes está relacionada com o fator de risco para o desenvolvimento de uma disfunção temporomandibular severa, o presente estudo apresentou os seguintes objetivos:

(1) Avaliar o desenvolvimento de condições dolorosas induzidas pelo diabetes na ATM de ratos através dos testes de avaliação do comportamento nociceptivo induzido pela formalina e/ou capsaicina.

(2) Avaliar as alterações da expressão das isoformas da proteína quinase C— $PKC\alpha$ ,  $PKC\beta_1$ ,  $PKC\beta_2$ ,  $PKC\delta$  e  $PKC\epsilon$ —no tecido periarticular em ratos diabéticos através do método Western Blot.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos machos Wistar provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório) e mantidos no Biotério da FOP-UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (4 por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) e temperatura ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, protocolo 2835-1 (Anexo I) e estão de acordo com as diretrizes determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), em animais conscientes (Zimmermann, 1983).

### 4.2. Delineamento experimental

Para realização dos experimentos os animais foram divididos em 2 grupos:

GRUPO I: Normoglicêmicos

GRUPO II: Diabéticos

Nos tempos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após indução do diabetes, todos os animais receberam uma injeção intra-articular, na ATM direita, de  $30\mu\text{L}$  de Formalina 1.5% (Roveroni *et al.*, 2001) ou capsaicina 1.5% e os comportamentos nociceptivos foram avaliados (item 4.4). Imediatamente após as análises comportamentais os animais foram mortos por decapitação para remoção de amostras de tecido periarticular e posterior realização das análises por Western Blot (item 4.5). Foram utilizados 4 a 6 animais por grupo experimental.

### 4.3. Indução do Diabetes

O diabetes foi induzido nos animais com 2 meses de idade, por meio de uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ; Sigma-Aldrich, USA) 75 mg/kg (Courteix *et al.*, 2007) dissolvida em 0,1 M de tampão citrato (pH 4.5). Os animais foram submetidos a um jejum de 8 horas antes da injeção de STZ. A indução do diabetes foi confirmada através da dosagem do nível de glicose plasmática por amostras de sangue da veia caudal utilizando o método enzimático glicose-oxidase (Optium Xceed; Abbott). Foram considerados para o estudo apenas os animais que apresentaram concentração plasmática de glicose maior que 300 mg/dl após jejum de 8 horas (Braga *et al.*, 2011). Os animais normoglicêmicos (controle) receberam uma injeção intraperitoneal apenas do veículo. O peso corporal e a concentração de glicose plasmática foram avaliados semanalmente durante todo o período experimental, conforme descrito acima.

### 4.4. Avaliação do desenvolvimento de condições comportamentais na ATM de ratos

Assessões de teste foram realizadas durante a fase clara entre 9h e 17h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C (Rosland, 1991). Durante os testes os animais não tiveram acesso à água ou à comida. Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais, os animais foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período de 7 dias. Na realização das análises comportamentais usou-se uma caixa de observação medindo 30x30x30 cm com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro. Cada animal foi inicialmente colocado emantidona caixa por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse (Abbott *et al.* 1986).

**4.4.1. Injeções na região da ATM:** Para administração de formalina ou capsaicina na região da ATM direita os animais foram brevemente anestesiados por inalação de Isoflurano. A seguir, uma agulha calibre 30, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50 µl) por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção

inferior da borda pósterio-inferior do arco zigomático, sendo avançada em direção anterior até contactar a região pósterio-lateral do côndilo.

**4.4.2. Teste comportamental:** Imediatamente após a injeção intra-articular o animal já consciente, foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a patinha anterior e a posterior e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 min. para os animais tratados com formalina e 30 min. para os animais tratados com capsaicina. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células (Roveroni *et al.*, 2001). Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1 s de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado (Roveroni *et al.*, 2001).

#### **4.5. Avaliação da expressão das isoformas da PKC no tecido periarticular**

##### **- Western Blot**

As amostras do tecido periarticular foram homogeneizadas em tampão PBS, pH 7.4, contendo inibidores de protease: etilenodiamina tetracetato de sódio (EDTA) 10 mM, Benzamidina 1 mM, fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 0,3 mM, Aprotinina 0,3  $\mu$ M e  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, em banho de gelo. Uma alíquota do homogeneizado foi separada por eletroforese de proteínas. Em seguida as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas "overnight" a 4°C com tampão de bloqueio {PBS 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% Tween 20}. As membranas foram lavadas três vezes com PBS 0,1% Tween 20. Em seguida foram incubadas em solução de PBS contendo 5% de leite desnatado e 0,1% Tween 20 contendo anticorpo primário específico para cada isoforma

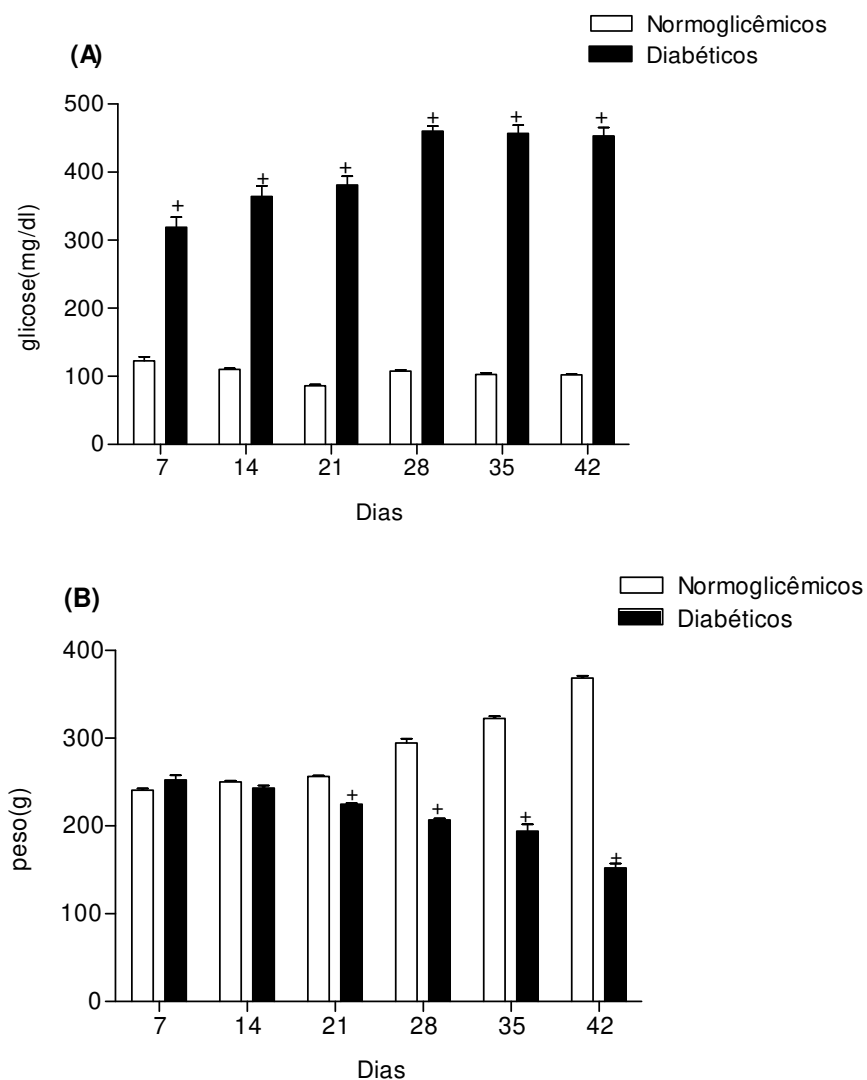
testada. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a HRP e novamente lavadas. As membranas foram então reveladas com kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.) como descrito no manual de instruções. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário. A densitometria das bandas foi realizada através do programa Image J. Os dados foram normalizados considerando o controle (NG) igual ao valor 1.

#### **4.6. Análise dos Resultados**

Os dados foram avaliados pela análise de variância a dois critérios de avaliação (Two-way ANOVA). As comparações múltiplas foram feitas pelo Teste de Bonferroni. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ . O programa GraphPad Prism 4.0 foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos.

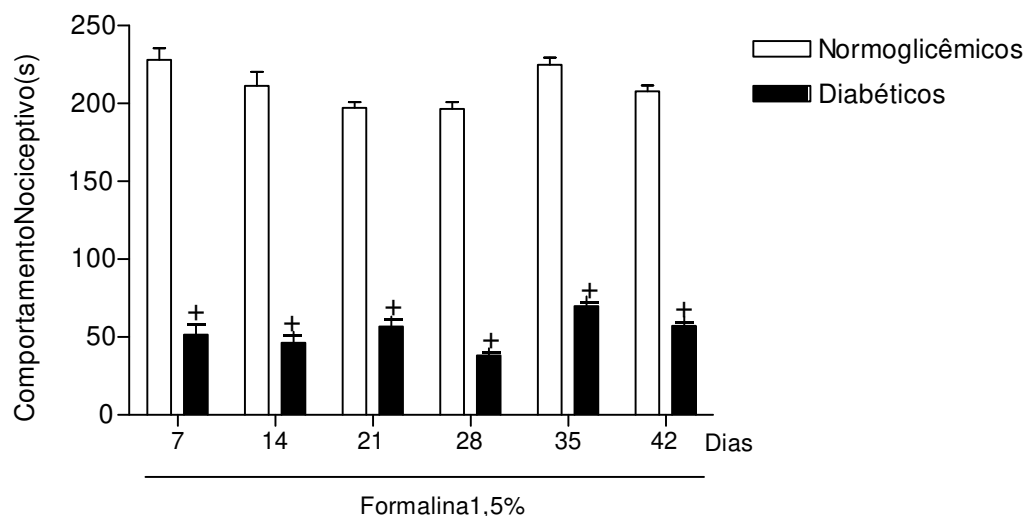
## 5.RESULTADOS

Todos os animais foram pesados imediatamente antes da indução do diabetes, e durante o experimento foram feitas medidas da glicemia e do peso corporal após um jejum de 8 horas. Conforme demonstrado na Figura 1, os animais diabéticos demonstraram aumentos significativos da concentração plasmática de glicose (Figura 1A), assim como uma perda progressiva de peso (Figura 1B) ao longo do tempo, confirmando a indução e manutenção da doença.



**Figura1. Dosagem de Glicemia (mg/dl) e Peso Corporal (g) em relação ao tempo em animais diabéticos.** (A) Os animais diabéticos apresentaram concentração de glicose plasmática acima de 300 mg/dl 7 dias após a indução do diabetes. Os animais diabéticos apresentaram uma concentração de glicose plasmática significativamente maior em relação aos normoglicêmicos em todos os tempos testados ( $p < 0,05$ : Two-ANOVA, Teste de Bonferroni). (B) Foi observada uma perda significativa e progressiva do peso dos animais diabéticos 21 dias após a indução do diabetes. Os animais diabéticos apresentaram peso corporal significativamente menor em relação aos normoglicêmicos a partir do 21º dia de indução da doença ( $p < 0,05$ : Two-ANOVA, Teste de Bonferroni). O símbolo (+) indicou diferença estatística entre animais normoglicêmicos e diabéticos.

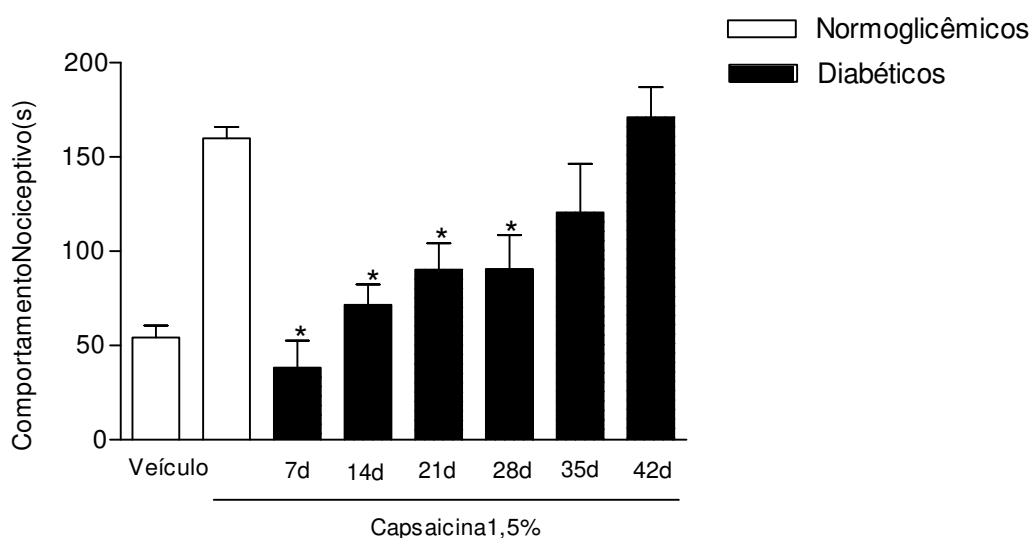
Os dados demonstraram que os animais diabéticos apresentaram hiponocicepção na ATM 7 dias após a indução do diabetes. Esta hiponocicepção foi observada até 42 dias após a indução do diabetes (Figura 2).



**Figura 2. Fase inicial do diabetes induz hiponocicepção na ATM.** A injeção intra-articular do agente inflamatório formalina (1,5%) induziu uma resposta nociceptiva significativamente menor nos ratos diabéticos quando comparados com os animais normoglicêmicos nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a indução da doença ( $p < 0,05$ : Two-way ANOVA, teste de Bonferroni). O símbolo (+) indicou diferença estatística entre os animais diabéticos e seus respectivos controles.



Com base nos resultados de hiponocicepção observados no gráfico anterior, os experimentos foram replicados e os animais tratados com uma injeção intra-articular de capsaicina, um estímulo nocivo que induz resposta nociceptiva através dos receptores vanilóides TRPV1 nas fibras C-nociceptivas periféricas (Tominaga and Tominaga, 2005; Nilius et al., 2007; Zhan et al., 2007). Os resultados demonstraram que os animais diabéticos apresentaram hiponocicepção apenas 7, 14, 21 e 28 dias após a indução do diabetes.

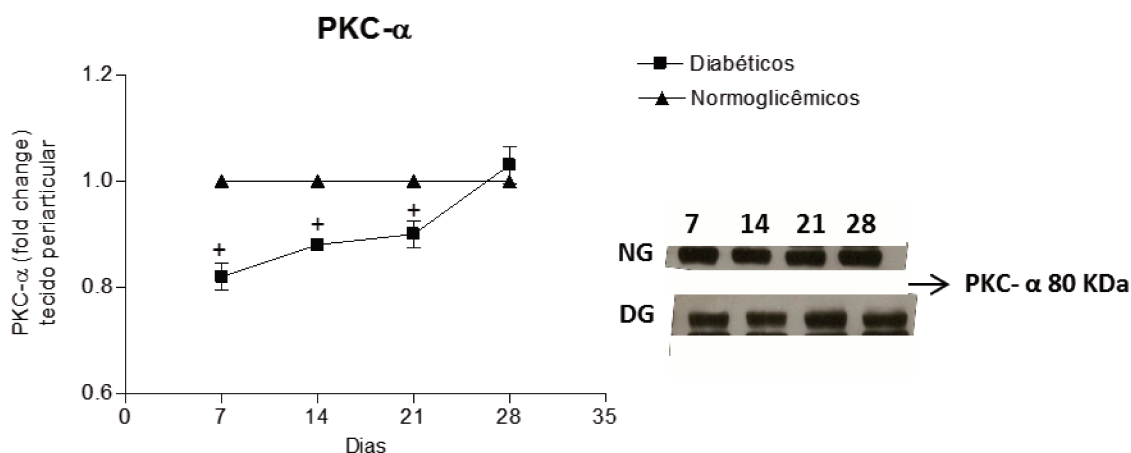


**Figura 3. Avaliação da indução da hiponocicepção pela fase inicial do diabetes na ATM pelo teste da capsaicina.** A injeção intra-articular de capsaicina (1,5%) induziu uma resposta nociceptiva significativamente menor nos ratos diabéticos quando comparados com os animais normoglicêmicos nos dias 7, 14, 21 e 28 dias após a indução da doença ( $p < 0.05$ : ANOVA, teste de Tukey). O símbolo (\*) indica diferença estatística entre os animais diabéticos e seus respectivos controles.

Considerando os resultados acima descritos, em uma segunda etapa de experimentos, foi avaliada a relação da expressão de diferentes isoformas da PKC com a hiponocicepção induzida pelo diabetes nos dias 7, 14, 21 e 28 dias após a indução da doença.

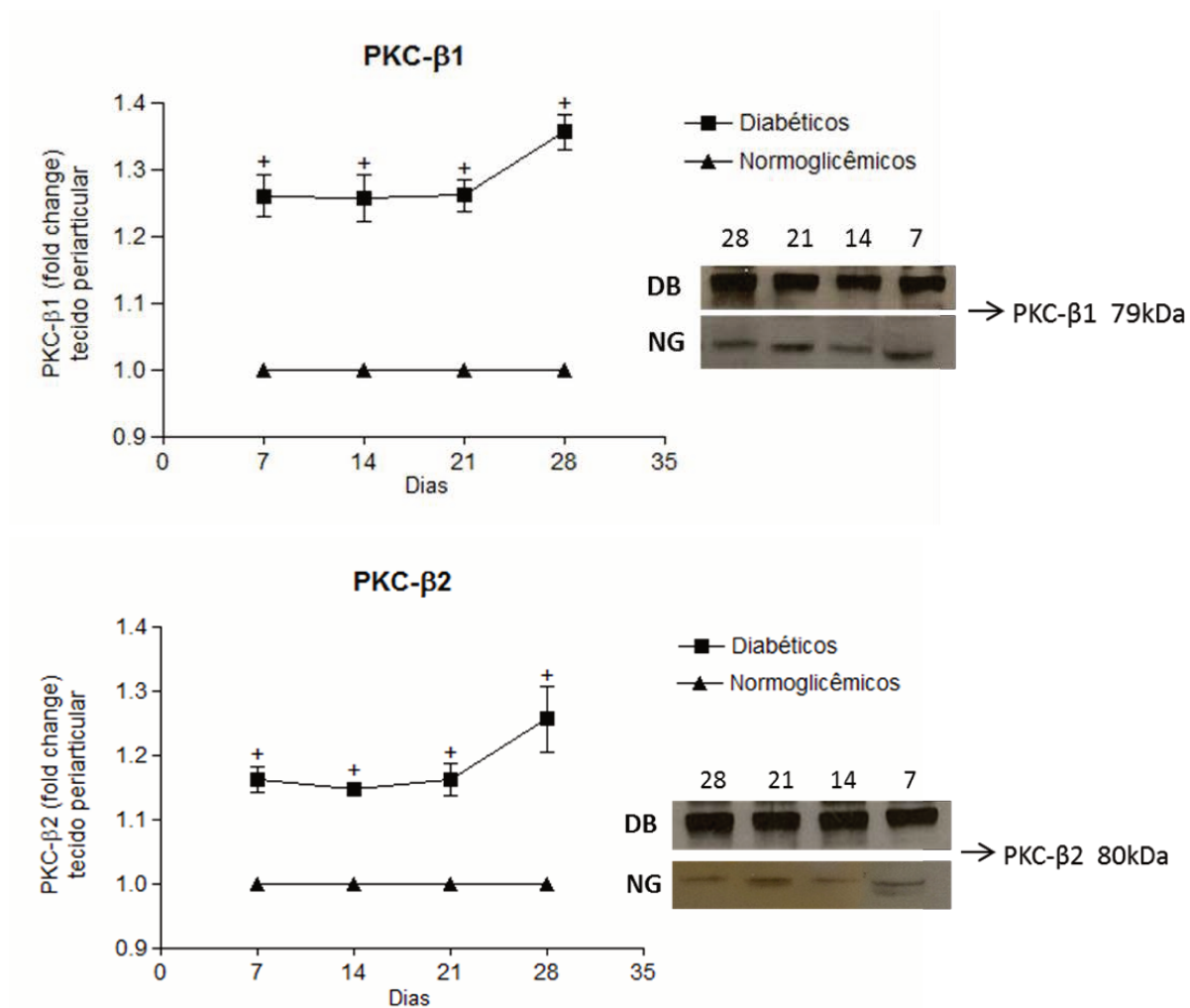
Foram avaliadas 5 isoformas da PKC no tecido periarticular da ATM testada: PKC- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ), PKC- $\beta$ 1 (PKC- $\beta$ 1), PKC- $\beta$ 2 (PKC- $\beta$ 2), PKC- $\delta$

(PKC- $\delta$ ) e PKC-epsilon (PKC- $\epsilon$ ). Os resultados demonstraram que os animais diabéticos apresentaram uma expressão da PKC- $\alpha$  significativamente menor em relação aos normoglicêmicos (Figura 4).



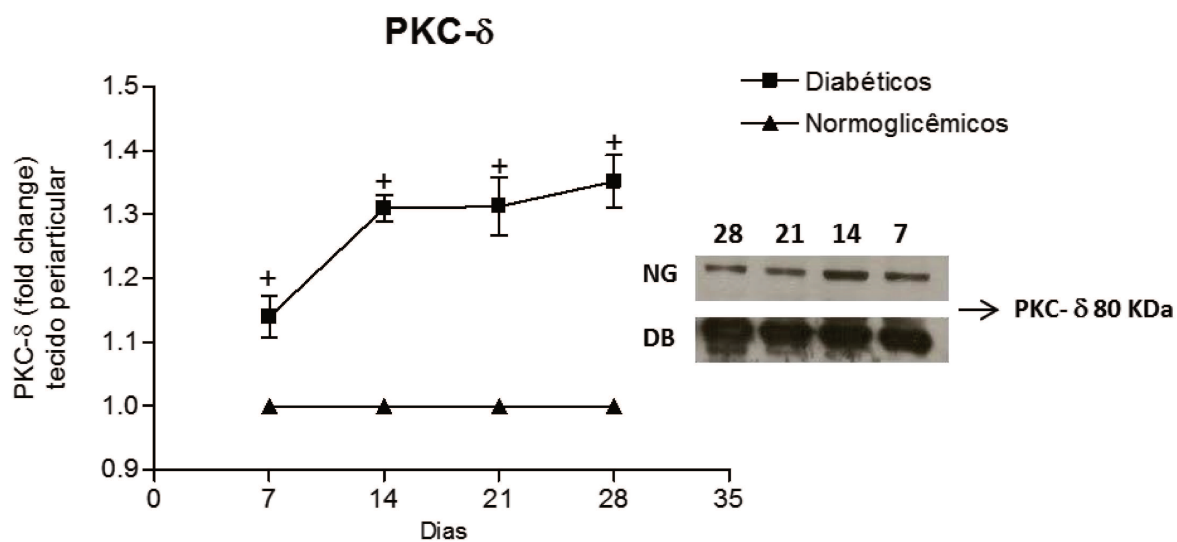
**Figura 4:** Avaliação da expressão da PKC- $\alpha$  no tecido periarticular de animais diabéticos (DB) em relação aos normoglicêmicos (NG). A expressão da PKC- $\alpha$  no tecido periarticular dos animais diabéticos (DB) foi significativamente menor em relação aos animais normoglicêmicos (NG) nos tempos 7, 14 e 21 dias ( $p < 0.05$ ; Two-way ANOVA, teste de Bonferroni). O símbolo (+) indica diferença estatística entre os grupos.

A análise por Western Blot das demais isoformas demonstraram que a expressão da PKC- $\beta_1$  e PKC- $\beta_2$  (Figura 5), PKC- $\delta$  (Figura 6) e PKC- $\epsilon$  (Figura 7) foi significativamente maior nos animais diabéticos em relação aos animais normoglicêmicos. A expressão das proteoquinases PKC- $\beta_1$  e PKC- $\beta_2$  estão aumentadas nos animais diabéticos já a partir do 7º dia da indução do diabetes (Figura 5).



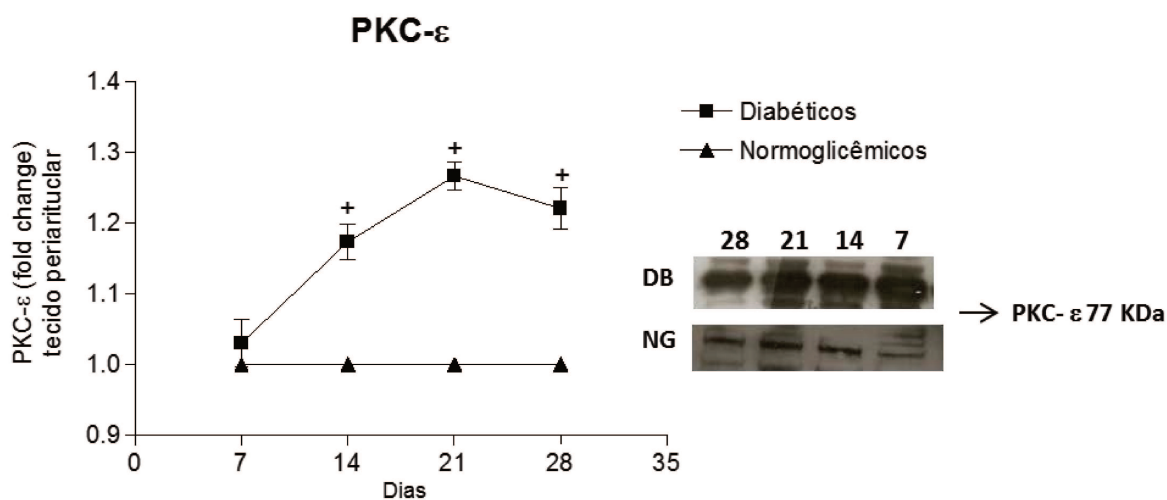
**Figura 5: Avaliação da expressão de PKC-β1 e PKC-β2 na ATM de animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos.** A expressão da PKC-β1 e PKC-β2 no tecido periarticular dos animais diabéticos (DB) foi significativamente maior em relação aos animais normoglicêmicos (NG) em todos os tempos testados ( $p < 0.05$ ; Two-way ANOVA, Teste de Bonferroni). O símbolo (+) indica diferença estatística entre os grupos.

A expressão de PKC-δ foi significativamente maior nos animais diabéticos a partir do 7º dia da indução da doença (Figura 6).



**Figura 6: Avaliação da expressão da PKC- $\delta$  na ATM de animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos.** A expressão da PKC- $\delta$  no tecido periarticular dos animais diabéticos (DB) foi significante maior em relação aos animais normoglicêmicos (NG) em todos os tempos posteados ( $p < 0.05$ ; Two-way ANOVA, teste de Bonferroni). O símbolo (+) indicadiferença estatística entre os grupos.

A expressão da PKC- $\epsilon$  foi significativamente menor nos animais diabéticos a partir do 7º dia da indução da doença (Figura 7).



**Figura 7: Avaliação da expressão da PKC- $\epsilon$  na ATM de animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos.** A expressão da PKC- $\epsilon$  no tecido periarticular dos animais diabéticos (DB) foi significante maior em relação aos animais normoglicêmicos (NG) a partir do 21º dia de indução da doença ( $p < 0.05$ ; Two-way ANOVA, teste de Bonferroni). O símbolo (+) indica diferença estatística entre os grupos.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que o diabetes induz uma hiponocicepção na ATM a partir do 7º dia de indução da doença. Estes dados sugerem que a fase inicial do diabetes induz uma alteração sensorial no sistema trigeminal que pode estar relacionado com as lesões dos tecidos orais de pacientes diabéticos (Collin *et al.*, 2000; Arap *et al.*, 2010; Zhu & Nilolajczyk, 2014).

No presente estudo o diabetes foi induzido nos animais através de uma injeção intraperitoneal de STZ (75 mg/kg) (Daulha *et al.*, 2006; Courteix *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2013), sendo que a confirmação da instalação da doença foi feita pela dosagem periódica da concentração plasmática de glicose e avaliação do peso corporal dos animais. De acordo com a evolução da doença, os animais diabéticos demonstraram glicemias superiores a 300 mg/dl e perda progressiva do peso corporal, validando o modelo experimental.

A indução do diabetes através da STZ é um modelo experimental comumente utilizado para a avaliação das alterações nociceptivas induzidas pelo diabetes (Daulha *et al.*, 2006; Courteix *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2013). A STZ é uma nitrosamida largamente utilizada como indutora de diabetes em animais experimentais, que tem como efeito, a destruição das células beta-pancreáticas e consequentemente uma deficiência na produção de insulina. A literatura demonstra que a indução experimental do diabetes com STZ em roedores induz hipernocicepção em diferentes modelos experimentais. Particularmente, tem sido demonstrado que o diabetes induz hipernocicepção na pata 3a 4 semanas após o tratamento sistêmico com STZ (Daulha *et al.*, 2006; Courteix *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2013).

A literatura tem demonstrado que as estruturas orofaciais são afetadas pelo diabetes (Troger *et al.*, 1999; Collin *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 2001), no entanto, o número de estudos é escasso e os dados contraditórios em relação às alterações na inervação trigeminal pelo diabetes. Utilizando o modelo de diabetes induzido pela STZ, Rodella *et al.* (2000) demonstrou que a fase inicial do diabetes induz hipernocicepção térmica facial após 8 a 12 semanas depois da injeção da STZ, enquanto Nones *et al.* (2013) não observou diferença na estimulação térmica e tátil orofacial na fase inicial do diabetes. Em uma análise

comparativa entre os dois estudos supra citados e o atual trabalho, dois aspectos devem ser observados: a região avaliada entre os estudos (pata, face e ATM) e o tipo de teste utilizado para detecção das alterações da sensibilidade somática (teste térmico, mecânico e por agente químico).

Em relação à região avaliada entre os estudos sabe-se que a diferença entre tecidos subcutâneos (face, pata e lábio) e tecidos profundos (ATM) resulta do fato de que estes tecidos são predominantemente inervados por diferentes subtipos de neurônios aferentes primários. Devido a isso, todas as inervações de tecido profundo induzir uma maior ativação na excitabilidade de neurônios centrais em relação às inervações de tecidos cutâneos, maiores distúrbios sensoriais podem ocorrer em condições dolorosas envolvendo tecidos profundos (Imbe *et al.*, 2001). Além disso, já foi demonstrado que os tecidos da ATM são mais sensíveis a processos inflamatórios envolvendo liberação de aminas simpáticas e  $\text{PGE}_2$  do que tecidos cutâneos (Rodrigues *et al.*, 2006).

Outro ponto a ser considerado é a diferença de testes utilizados nos diferentes estudos. O teste térmico detecta principalmente ativação de fibras nociceptivas superficiais, enquanto o teste mecânico detecta nociceptores subcutâneos, envolvendo diferentes mecanismos na ativação destas diferentes fibras nociceptivas (Vivancos *et al.*, 2003; Pedrosa, 2011).

O teste da formalina (teste químico) induz uma hipernocicepção produzida pela sensibilização periférica dos nociceptores e estruturas neuronais envolvidas (Roveroni *et al.*, 2001; Clemente *et al.*, 2004). No presente estudo, foi utilizada formalina na concentração de 1.5%, considerada uma concentração da formalina (teste químico), induz uma hipernocicepção produzida pela sensibilização periférica dos nociceptores submáxima (Roveroni *et al.*, 2001; Clemente *et al.*, 2004) permitindo avaliar respostas tanto hipernociceptivas quanto hiponociceptivas de alterações sensoriais neuronais. Sendo assim, pode-se hipotetizar que o fato da ATM envolver tecidos profundos com diferentes subtipos de inervações somáticas e serem mais responsivos a mediadores inflamatórios, pode explicar, pelo menos em parte, as diferenças encontradas entre os estudos.

O presente estudo demonstrou que o diabetes induz hiponocicepção na ATM observado pelo teste da formalina até 42 dias após o tratamento sistêmico com STZ. Para

confirmar e verificar um possível mecanismo envolvido com a hiponocicepção, os experimentos foram replicados utilizando o teste da capsaicina. No entanto, a hiponocicepção induzida pelo diabetes na ATM foi observada no teste da capsaicina até 28 dias após o tratamento sistêmico com STZ.

O teste da formalina é um teste amplamente utilizado para avaliação dos efeitos de novas drogas analgésicas e/ou anti-inflamatórias em animais experimentais. O agente nociceptivo formalina induz uma resposta dolorosa bifásica: a primeira fase (neuronal) é caracterizada pela ativação de receptores TRPA1 nos neurônios nociceptivos aferentes primários; enquanto que a segunda fase (inflamatória) é resultado de uma sensibilização dos nociceptores e estruturas neuronais com projeção central (McNamara *et al.*, 2007). Basicamente a injeção em tecidos periféricos do agente formalina age diretamente nos receptores TRPA1 (receptores do tipo ionotrópicos) ativando as fibras nociceptivas primárias, mas também, induz dano tecidual e consequentemente migração de células inflamatórias, particularmente os mastócitos. Uma vez ativados, os receptores TRPA1, via liberação de neuroquininas, estimulam a degranulação dos mastócitos liberando histamina e 5-hidroxitriptamina, que através de uma ação sinérgica, sensibilizam as fibras C-nociceptivas desenvolvendo um quadro de hipernocicepção (Parada *et al.*, 2001; Ting *et al.*, 2007; Macpherson *et al.*, 2007; MacNamara *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2008).

Por outro lado a capsaicina é conhecida por ativar receptores vanilóides do tipo TRPV1 nas fibras periféricas C-nociceptivas que aumentam a condutância das correntes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  resultando em comportamentos nociceptivos (Tominaga and Tominaga, 2005; Nilius *et al.*, 2007). Tanto os receptores TRPA1 como os receptores TRPV1 aumentam a permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ . O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ativa cascatas de sinalizações bioquímicas, como por exemplo, a via fosfolipase C (PLC)/diacilglicerol (DAC) / Proteína quinase C que por sua vez resulta na sensibilização de fibras aferentes primárias (Costigan and Woolf, 2000; Woolf and Salter, 2000). Sendo assim, a diferença entre os resultados obtidos nos testes da formalina e capsaicina podem estar relacionados com o mecanismo de ação de cada um dos respectivos agentes algésicos.

A neuropatia sensorial periférica representa uma complicação comum e debilitante em pacientes diabéticos que acomete em proporção crescente nestes pacientes



durante a progressão da doença (Daulhac *et al.*, 2006). Em decorrência da debilitação severa das neuropatias induzidas pelo diabetes, estudos vêm explorando seus mecanismos para melhor entendimento da doença e assim desenvolver novas perspectivas terapêuticas para seu controle e tratamento (Boulton *et al.* 2005).

Vários são os mecanismos descritos envolvidos na gênese da neuropatia diabética: com liberação de metabólitos, alterações vasculares e reações autoimunes. No entanto, a literatura sugere uma relação direta entre o estado hiperglicêmico, mantido cronicamente e as complicações micro e macrovasculares, suportando a hipótese de que a hiperglicemia seja o fator determinante na gênese das complicações do diabetes. Tem sido demonstrado que a hiperglicemia induz as complicações neurovasculares através da ativação da via Diacilglicerol/Proteína quinase C (DAG/PKC) (Evcimen and King, 2007).

O DAG é o principal ativador fisiológico da PKC. O aumento dos níveis de DAG no diabetes pode ocorrer através de múltiplas vias (Evcimen and King, 2007). O DAG pode ser derivado da hidrólise de fosfatidilinosídeos; pelo metabolismo da fosfatidilcolina por ação da fosfolipase C; ou pela síntese através dos intermediários glicolíticos, fosfato de diidroxiacetona e gliceral-3-fosfato; com subsequente ativação da PKC (Evcimen and King, 2007). A via DAG/PKC também pode ser ativada pela hiperglicemia como resultado do aumento do estresse oxidativo, como por exemplo, pelo aumento do oxidante  $H_2O_2$ , o qual é um conhecido ativador da PKC, seja de forma direta ou indireta pelo aumento da produção do DAG. (Konishi *et al.*, 1997; Nishikawa *et al.*, 2000).

A PKC é um grupo de enzimas membros da família de proteínas quinases dependentes do AMPc, que apresentam múltiplas funções celulares e afetam muitas vias de transdução de sinais. No entanto, o mecanismo pelo qual a PKC contribui para o desenvolvimento da neuropatia diabética ainda não está esclarecido. No presente estudo foi demonstrado que a hipotalgesia demonstrada nos animais diabéticos está relacionada com o aumento da expressão das PKC- $\beta$ 1, PKC- $\beta$ -2, PKC- $\delta$  e PKC- $\epsilon$  e diminuição da expressão da PKC- $\alpha$ .

O importante papel do aumento das atividades da aldose redutase (importante mediador no metabolismo da glicose) e de diferentes isoformas da PKC relatado em estudos

experimentais têm sido confirmados em estudos clínicos em pacientes diabéticos com polineuropatia sensorio-motora (Obrosova 2009). Particularmente, a PKC- $\beta$  (Sasane *et al.*, 2005) e PKC- $\epsilon$  (Hucho *et al.*, 2005) estão diretamente envolvidas no desenvolvimento da hipernocicepção (incluindo hipernocicepção decorrente do diabetes), enquanto que a PKC- $\delta$  e PKC- $\alpha$  estão vinculadas a danos neurais (Robert *et al.*, 1997; Sakae *et al.*, 2003). É importante ressaltar, que pesquisas para o desenvolvimento de possíveis tratamentos para a neuropatia induzida pelo diabetes vêm utilizando inibidores destes mediadores (Obrosova, 2009).

O aumento da expressão das PKC- $\beta$ , PKC- $\delta$  e PKC- $\epsilon$  relacionado à hiperglicemia induzida pelo diabetes demonstrado no presente estudo, corrobora a literatura, no entanto, na ATM foi observado quadro de hiponocicepção. Por outro lado, a expressão da PKC- $\alpha$  foi significativamente menor nos animais diabéticos em relação aos animais normoglicêmicos. Considerando o fato de que existe uma relação entre PKC- $\alpha$  e a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$  (Yang *et al.*, 2012); e que o diabetes induz uma inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$  promovendo uma retenção de  $\text{Na}^+$ , com consequente edema da bainha mielínica, disjunção axoglial e degeneração nervosa (Gagliardi *et al.*, 2003), é possível que nos tecidos da ATM a fase inicial do diabetes induza uma diminuição na expressão PKC- $\alpha$  e consequentemente inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ , diminuindo assim a excitabilidade neuronal e consequentemente induzindo a uma hiponocicepção.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a fase inicial do diabetes induz uma hiponocicepção na ATM de ratos e está associada ao aumento da expressão das isoformas PKC- $\beta$ 1, PKC- $\beta$ 2, PKC- $\delta$  e PKC- $\epsilon$ , assim como com a diminuição da expressão da PKC- $\alpha$ .

## REFERÊNCIAS

- AbbottFV, FranklinKB, ConnellB. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. *Eur J Pharmacol*, 1986; 126: 141-4.
- ArapA, SiqueiraSR, SilvaCB, TeixeiraMJ, SiqueiraJT. Trigeminal pain and quantitative sensory testing in painful peripheral diabetic neuropathy. *Arch Oral Biol*. 2010 Jul; 55(7): 486-93.
- ArezzoJC, ZotovaE. Electrophysiologic measures of diabetic neuropathy: mechanism and meaning. *Int Rev Neurobiol*. 2002; 50: 229-55.
- BorghiniI, Ania-LahuertaA, RegazziR, FerrariG, GjinovciA, WollheimCB, PralongWF. Alpha, betaI, betaII, delta, and epsilon protein kinase C isoforms and compound activity in the sciatic nerve of normal and diabetic rats. *J Neurochem*. 1994; 62: 686-696.
- BoultonAJM, MalikRA, ArezzoJC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care*, 2004; 27(6): 1458-1486.
- BoultonAJ, VinikAI, Arezzo JC, BrilV, Feldman EL, FreemanR, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 2005; 28(4): 956-962.
- BragaSM, TaddeiSR, AndradeI Jr, Queiroz-JuniorCM, GarletGP, RepekeCE, TeixeiraMM, daSilvaTA. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral Sci*. 2011; 119(1): 7-14.
- CalcuttNA. Experimental models of painful diabetic neuropathy. *J Neurol Sci*. 2004; 220(1-2): 137-139.
- ClementeJT, ParadaCA, VeigaMC, GearRW, and TambeliCH. Sexual dimorphism in the antinociception mediated by kappa opioid receptors in the rat temporomandibular joint. *Neurosci Lett* 2004; 372: 250-255.
- CollinHL, NiskanenL, UusitupaM, Töyry J, CollinP, KoivistoAM, ViinamäkiH, MeurmanJH. Oral symptoms and signs in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. A focus on diabetic neuropathy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000; 90(3): 299-305
- Costigan M, Woolf CJ: Pain: molecular mechanisms. *J Pain* 2000; 1: 35-44.

- Courteix C, Privat AM, Pélissier T, Hernandez A, Eschalier A, Fialip J. Agmatine induces antihyperalgesic effects in diabetic rats and a superadditive interaction with R(-)-3-(2-carboxypiperazine-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid, a N-methyl-D-aspartate-receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 322(3): 1237-1245.
- Daulhac L, Mallet C, Courteix C, Etienne M, Duroux E, Privat AM, Eschalier A, Fialip J. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. *Mol Pharmacol*. 2006;70(4): 1246-1254.
- Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res*. 2007; 55(6):498-510.
- Fischer L, Tambeli CH, Parada CA: TRPA1-mediated nociception. *Neuroscience* 2008;155:337-338.
- Geraldes P, King GL. Activation of Protein Kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation Research* 2010; 106:1319-1331.
- Hucho TB, Dina OA, Levine JD. Epac mediates a cAMP to PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. *J Neurosci*. 2005 Jun 29;25(26):6119-26.
- Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2001 Jun;44(6):659-73.
- Imbe H, Iwata K, Zhou Q, Zou S, Dubner R, and Ren K (2001) Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation and trigeminal neuronal activation implications for persistent temporomandibular pain. *Cells Tissues Organs* **169**:238–247.
- Johnson MS, Ryels JM, Wright DE. Diabetes-Induced Chemogenic Hypoalgesia is paralleled by attenuated stimulus-induced Fos expression in the spinal cord of diabetic mice. *J. Pain*, 2007 August;8(8): 637-649.
- Kim J, Rushovich EH, Thomas TP, Ueda T, Agranoff BW, Greene DA. Diminished specific activity of cytosolic protein kinase C in sciatic nerve of streptozocin-induced diabetic rats and its correction by dietary myo-inositol. *Diabetes*. 1991;40:1545–1554.

- Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, et al. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:11233–7.
- Lei T, Jing D, Xie K, Jiang M, Li F, Cai J, Wu X, Tang C, Xu Q, Liu J, Guo W, Shen G, Luo E. Therapeutic effects of 15 Hz pulsed electromagnetic field on diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-treated rats. *PLoS One*. 2013; Apr 18;8(4):e61414.
- Libman IM, Laporte RE, Tull ES, Matsushima M. Insulin independent diabetes mellitus in the 21st century and beyond: a model disease for global health? *Diabetes Metab*. 1993; 19(1 Pt 2):74–9.
- Lin WH, Wang MC, Wang WM, Yang DC, Lam CF, Roan JN, et al. Incidence of and mortality from Type 2 Diabetes in Taiwan From 1999 through 2010: A Nationwide Cohort Study. *PLoS One*. 2014; 9(1): e86172.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain.
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 2007; 445:541–555.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007; 87:165–217.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature* 2000; 404:787–90.
- Nones CF, Reis RC, Jesus CH, Veronez DA, Cunha JM, Chichorro JG. Orofacial sensory changes after streptozotocin-induced diabetes in rats. *Brain Res* 2013; 1501:56–67.

- Obrosova IG. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. *Neurotherapeutics*. 2009 Oct;6(4):638-47.
- Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH: The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 2001;102:937-944.
- Pedrosa HC. Neuropatia Diabética. E-book, 2011, Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em [www.diabetes.org.br](http://www.diabetes.org.br).
- Raddatz K, Frangioudakis G, Diakanastasis B, Liao BM, Leitges M, Schmitz-Peiffer C. Deletion of protein kinase C  $\epsilon$  in mice has limited effects on liver metabolite levels but alters fasting ketogenesis and gluconeogenesis. *Diabetologia*. 2012 Oct;55(10):2789-93
- Roberts RE, McLean WG. Protein kinase C isozyme expression in sciatic nerves and spinal cords of experimentally diabetic rats. *Brain Res*. 1997 Apr 18;754(1-2):147-56.
- Rodella L, Rezzani R, Corsetti G, Bianchi R, 2000. Nitric oxide involvement in the trigeminal hyperalgesia in diabetic rats. *Brain Res*. 865, 112–115.
- Rodrigues LLFR, Oliveira MCG, Pelegrini-da-Silva A, Parada CA, and Tambeli CH. Peripheral sympathetic component of the temporomandibular joint inflammatory pain in rats. *J Pain* 2006;7:929–936.
- Rogers LC, Frykberg RG, Armstrong DG, Boulton AJ, Edmonds M, Van GH, Hartemann A, Game F, Jeffcoate W, Jirkovska A, Jude E, Morbach S, Morrison WB, Pinzur M, Pitocco D, Sanders L, Wukich DK, Uccioli L. The Charcot foot in diabetes. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2011 Sep-Oct;101(5):437-46.
- Rosland JH. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain*. 1991; 45: 211-6.
- Roveroni RC, Parada CA, Cecilia MV, et al. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain*. 2001;94: 185-91.
- Sakaue Y, Sanada M, Sasaki T, Kashiwagi A, Yasuda H. Amelioration of retarded neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons by overexpression of PKC  $\delta$  in diabetic rats. *Neuroreport*. 2003 Mar 3;14(3):431-6.
- Sasase T, Yamada H, Sakoda K, Imagawa N, Abe T, Ito M, Sagawa S, Tanaka M, Matsushita M. Novel protein kinase C- $\beta$  isoform selective inhibitor JTT-010

- ameliorates both hyper- and hypoalgesia in streptozotocin- induced diabetic rats. *Diabetes Obes Metab.* 2005 Sep;7(5):586-94.
- Sindrup SH, Jensen TS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain.* 1999;83(3): 389-400.
- Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes.* 2003; 52(12): 2867-2873.
- Tesfaye S, *etal.* Arterio-venous shunting and proliferating new vessels in acute painful neuropathy of rapid glycaemic control (insulin neuritis). *Diabetologia.* 1996;39(3):329-35.
- Tesfaye S, *etal.* Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care.* 2010;33(10):2285-93.
- Tesfaye S, Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28 Suppl 1:8-14.
- Thomaz, João Batista et al. Fundamentos de cirurgia vascular e angiologia, Fundação BYK, São Paulo, 1977
- Ting E, Roveroni RC, Ferrari LF, Lotufo CM, Veiga MC, Parada CA, Tambeli CH: Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. *Life Sci* 2007;81:765-771.
- Tominaga M, Tominaga T: Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch* 2005;451:143-150.
- Troger J, Humpel C, Kremser B, Kralinger M, Teuchner B, Kunze C, Philipp W, Kieselbach G, 1999. The effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on substance P and calcitonin gene-related peptide expression in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res.* 842, 84–91.
- Vivancos GG, Parada CA, and Ferreira SH (2003) Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. *Br J Pharmacol* 138:1351–1357.
- Whiteside CI, Dlugosz JA. Mesangial cell protein kinase C isozyme activation in the diabetic milieu. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Jun;282(6):975-80.



- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000; 288(5472): 1765-1769.
- Yang J, Pollock JS, Carmines PK. NADPH oxidase and PKC contribute to increased Na<sup>+</sup> transport by the thick ascending limb during type 1 diabetes. *Hypertension*. 2012 Feb; 59(2): 431-6.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983; 16(2): 109-110.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001; 414(6865): 782-787.

## ANEXO1



CEVA!Unioe.mp

### ComissAo deEticanoUsodeAnimais CEUAIUnieamp

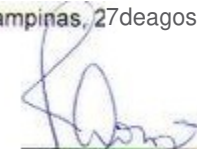
#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE NEUROPATIA DIABÉTICA EM RATOS E O PAPEL DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA SÉCIPK NESTE PROCESSO" (protocolo nº 2835 I), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Juliana Trindado Clemente Napimoga e **Augusto Muzilli Júnior**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Insetos em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 27 de agosto de 2012.

Campinas, 27 de agosto de 2012.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Chuaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretaria Executiva

CEUA/UNICAMP  
Cidade de Campinas  
13013-970 Campinas, SP - Brasil

Tel: (19) 321-6359  
E-mail: comit@uni.br  
http://www.ceua.unicamp.br