



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

JOÃO FELIPE RIBEIRO DOS SANTOS

**MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA ANALGESIA DO
MAROPITANT EM MODELO DE NEUROPATIA DIABÉTICA**

ILHÉUS – BAHIA

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

JOÃO FELIPE RIBEIRO DOS SANTOS

**MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA ANALGESIA DO
MAROPITANT EM MODELO DE NEUROPATIA DIABÉTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Lima de Lavor

ILHÉUS – BAHIA

2021

JOAO FELIPE RIBEIRO DOS SANTOS

**MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA ANALGESIA DO
MAROPITANT EM MODELO DE NEUROPATIA DIABÉTICA**

Ilhéus – BA,/...../2021

Mário Sérgio Lima de Lavor – Dsc
UESC /DCAA
(Orientador)

Juneo Freitas Silva - Dsc
UESC/DCB

Suzane Lilian Beier – Dsc
UFMG

ILHÉUS – BAHIA
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Maria Angelita e João Ribeiro, que sempre estiveram presentes na minha vida, apoiando todas as minhas decisões. Obrigada pelo amor incondicional e pelo exemplo de vida. A minha irmã Aline Ribeiro pelo apoio e ajuda sempre que necessário.

Ao meu orientador, Prof. Mário Sérgio Lima de Lavor, obrigado por ter acreditado e investido em mim, pela orientação e pelo apoio em todo o meu período do Mestrado. Exemplo de profissional, gratidão pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade, paciência e atenção. Se eu puder ser metade do profissional que o senhor é, já estarei extremamente satisfeito.

Aos funcionários do Hospital Veterinário e da UESC pela colaboração e disponibilidade, em especial à Márcia Sousa, Ivo Arouca e Jaciara, que fez com que meus longos dias de experimentos se tornassem menos desgastante e mais alegres. Obrigada por toda a ajuda, apoio e amizade dos alunos de iniciação e mestrado, especialmente a Raquel Niella, Claire Marques, Larissa Lima, Laíse, Sophia Saraiva, Iago, Adriana Lopes, Máira Kersul, Paula Fernanda, Luciano Cardoso, Luciana Oliveira, Larissa Rodrigues e Jessica Oliveira.

Agradeço ao Prof^o Juneo Freitas Silva por todo conhecimento compartilhado, disponibilidade e incentivo durante essa etapa. E aos meus colegas Bianca e Jeanne por toda ajuda, companheirismo e perseverança, foi um enorme prazer adquirir esse conhecimento sobre a imunistoquímica ao lado de vocês.

Aos componentes titulares da banca o professor Juneo Silva e a professora Suzane Beier grato por fazerem parte do meu crescimento.

A ZOETIS pela disponibilidade do fármaco para desenvolvimento da pesquisa, ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz.

A FAPESB pela concessão de bolsa de estudo e pelo financiamento, apesar de todos os esforços dos atuais governantes de viver no obscurantismo. A agência se manteve consciente de que é importante permanecer financiando o futuro da nossa nação. Parabéns pela resistência e que prossiga assim

Agradeço também aos meus amigos Leonardo Sauer, Hemilli Queiroz, Beatriz Freitas, Camilla Freitas, Giselle Gomes, Iarla Amorim, Lorena Silva, Patrick Muniz e Thais Fernandes por todo apoio fora da UESC que contaram e muito pra eu me

manter na linha e não perder a cabeça, a vocês de coração o meu multíssimo obrigado.

Um agradecimento especial aqueles que tornam a ciência um meio mais simples e de fácil acesso, isso só é possível graças aos desenvolvedores do Mendeley e a Alexandra Elbakyan (criadora sci-hub), que contribuem imensamente a comunidade científica.

MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA ANALGESIA DO MAROPITANT EM MODELO DE NEUROPATIA DIABÉTICA

RESUMO

A neuropatia diabética possui um mecanismo fisiopatológico que não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que a hiperglicemia está diretamente envolvida nos processos inflamatório e de estresse oxidativos. Os tratamentos comumente utilizados para essa enfermidade possuem efeitos colaterais exacerbados que torna sua utilização frustrante para o paciente e para o clínico. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios produzidos pela administração do maropitant em camundongos submetidos ao modelo de neuropatia diabética tipo 1, induzido pela administração de estreptozotocina. Para tanto foram utilizados 75 animais divididos em 5 grupos (n=15), Grupo controle negativo (GCN); Grupo Maropitant 72 horas - Neuropatia diabética + maropitant 30 mg/kg/24q (GMAR72); Grupo Maropitant 07 dias - Neuropatia diabética + maropitant 30 mg/kg/24q (GMAR07); Grupo controle positivo – Neuropatia diabética + Solução Salina 0,5 ml/kg/24q (GCP72); Grupo controle positivo 07 dias - Neuropatia diabética + Solução Salina 0,5 ml/kg/24q (GCP07) a indução do estado de hiperglicemia foi realizada com a administração de 160 mg/kg/IP de estreptozotocina. O limiar mecânico nociceptivo foi avaliado com o auxílio do analgesímetro digital e da avaliação do perfil inflamatório e de estresse oxidativo foi avaliado pela técnica de imunistoquímica para os marcadores anti-iba1, anti- TNF- α , anti-IL10, anti-GPx 1/2, anti- de HIF-1 α e ANTI-TACR1. O delineamento foi inteiramente casualizado, utilizou-se ANOVA seguindo teste SNK ($p < 0,05$). Com a dose de 30 mg/kg/IP, houve aumento significativo do limiar mecânico nociceptivo a partir de 30 minutos de avaliação com pico após duas horas de avaliação, redução da atividade glial, redução da expressão de TNF, elevação da expressão de IL10, aumento de GPx 1/2 e de HIF-1 α . Para os fatores TNF- α e GPx1/2, a expressão de receptores de taquicinas-1 houve correlação positiva e negativa moderada, respectivamente ($p < 0,05$). Conclui-se que o uso do maropitant na dose de 30mg/kg foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo

mecânico por duas horas, e diminuir a atividade glial, regular a atividade inflamatória e promover ação antioxidante no modelo de neuropatia diabética

Palavras-chave: Nocicepção. Inflamação. Glia. Hiperalgisia. Medula espinhal.

CELLULAR MECHANISMS INVOLVED IN MAROPITANT ANALGESIA IN A DIABETIC NEUROPATHY MODEL

ABSTRACT

Diabetic neuropathy has a pathophysiological mechanism that is not fully understood, but it is known that hyperglycemia is directly involved in inflammatory and oxidative stress processes. The treatments commonly used for this disease have exacerbated side effects that make its use frustrating for the patient and the clinician. Thus, the objective of this study was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effects produced by the administration of maropitant in mice submitted to the type 1 diabetic neuropathy model, induced by the administration of streptozotocin. For this purpose, 75 animals were used, divided into 5 groups (n = 15), negative control group (GCN); 72-hour Maropitant Group - Diabetic neuropathy + maropitant 30 mg / kg / 24q (GMAR72); Maropitant Group 07 days - Diabetic neuropathy + maropitant 30 mg / kg / 24q (GMAR07); Positive control group - Diabetic neuropathy + Saline solution 0.5 ml / kg / 24q (GCP72); Positive control group 07 days - Diabetic neuropathy + Saline solution 0.5 ml / kg / 24q (GCP07) the induction of hyperglycemia was performed with the administration of 160 mg / kg / IP of streptozotocin. The nociceptive mechanical threshold was evaluated with the aid of a digital analgesometer and the evaluation of the inflammatory profile and oxidative stress was assessed by the immunohistochemistry technique for the anti-iba1, anti-TNF- α , anti-IL10, anti-GPx 1 markers / 2, anti-HIF-1 α and ANTI-TACR1. The design was completely randomized, ANOVA was used following the SNK test ($p < 0.05$). With the dose of 30 mg / kg / IP, there was a significant increase in the mechanical nociceptive threshold after 30 minutes of evaluation with a peak after two hours of evaluation, reduced glial activity, reduced TNF expression, increased IL10 expression, increase of GPx 1/2 and HIF-1 α . For the factors TNF- α and GPx1 / 2, the expression of tachykinin-1 receptors showed a moderate positive and negative correlation, respectively ($p < 0.05$). It is concluded that the use of maropitant at a dose of 30mg / kg was able to increase the mechanical nociceptive threshold for two hours, and decrease glial activity, regulate inflammatory activity and promote antioxidant action in the diabetic neuropathy model

Keywords: Nociception. Inflammation. Glia. Hyperalgesia. Spinal cord.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1:** Esquema geral do modelo experimental28
- Figura 2:** Curva glicêmica após administração de estreptozotocina nos, maropitant 72 horas (GM72), maropitant 07 dias (GM7) e solução salina 07 dias e 72 horas e grupo controle (GC).....33
- Figura 3:** Curva glicêmica do teste de tolerância a glicose dos grupos controle (GC), maropitant 72 horas (GM3072), maropitant 07 dias (GM3007) e solução salina 07 dias, (SS07) e 72 horas (SS72).....34
- Figura 4:** Curva glicêmica do teste de sensibilidade à insulina dos grupos controle (GC), maropitant 72 horas (GM72), maropitant 07 dias (GM7) e solução salina 07 dias, (SS07) e 72 horas (SS72).....35
- Figura 5:** Limiar nociceptivo mecânico dos grupos controle (GC), maropitant (M307) e solução salina (SS07) após administração de maropitant e solução salina nos tempos de 30 min (A), 1 hora (B) E 2 horas (C) durante sete dias de administração. Valores representam média \pm EPM. * $p < 0,0001$ comparado ao SS07.....36
- Figura 6:** Contagem de células imunopositivas de IBA-1 na medula espinal de camundongos. (A-E) Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica de IBA-1 em (A) Grupo controle positivo 07 dias; (B) Grupo maropitant 30 mg 07 dias; (C) Grupo controle positivo 72 horas, (D) Grupo maropitant 30 mg 72 horas e (E) Grupo controle negativo (GC). (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). (F) Contagem de células imunopositivas medular de IBA- 1 (Média \pm SEM; $n=6$; * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$). Aumento de 40x.38
- Figura 7:** Expressão proteica de TNF- α na medula espinal de camundongos. (A-C) Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica de TNF- α em (A) Grupo controle positivo 07 dias; (B) Grupo maropitant 30 mg 07 dias; (C) Grupo controle negativo (GC). (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). (D) Área de

imunomarcaco em pixels da expressão medular de TNF- α (Média \pm SEM; n=6; ****P < 0,0001). Aumento de 40x.39

Figura 8: Expressão proteica de IL10 na medula espinal de camundongos. (A-E) Fotomicrografias da expressão imunoistoquimica de IL10 em (A) Grupo controle positivo 72 horas; (B) Grupo maropitant 30 mg 72 horas; (C) Grupo controle positivo 07 dias; (D) Grupo Maropitant 07 dias; (E) Grupo controle negativo. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). F) rea de imunomarcaco em pixels da expressão medular de IL10 (Média \pm SEM; n=6); ***P < 0,001); Aumento de 40x.40

Figura 9: rea de expressão do GPx 1/2 na medula espinal de camundongos. (A-D) Fotomicrografias da expressão imunoistoquimica de GPx 1/2 em (A) Grupo controle positivo 72 horas; (B) Grupo maropitant 30 mg 72 horas; (C) Grupo controle positivo 07 dias; (D) Grupo Maropitant 07 dias. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). (E) rea de imunomarcaco em pixels da expressão medular de GPx 1/2 (Média \pm SEM; n=6; ***P < 0,001 ****P < 0,0001); Aumento de 40x.42

Figura 10: rea de expressão do HIF-1 α na medula espinal de camundongos. (A-E) Fotomicrografias da expressão imunoistoquimica de HIF-1 α em (A) Grupo controle positivo 72 horas; (B) Grupo maropitant 30 mg 72 horas; (C) Grupo controle positivo 07 dias; (D) Grupo Maropitant 07 dias; (E) Grupo controle negativo (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). F) rea de imunomarcaco em pixels da expressão medular de HIF (Média \pm SEM; n=6); ****P < 0,0001; Aumento de 40x.44

Figura 11: rea de expressão do TACR1 na medula espinal de camundongos. (A-E) Fotomicrografias da expressão imunoistoquimica de TACR1 em (A) Grupo controle positivo 72 horas; (B) Grupo maropitant 30 mg 72 horas; (C) Grupo controle positivo 07 dias; (D) Grupo Maropitant 07 dias; (E) Grupo controle negativo. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). F) rea de

imunomarcação em pixels da expressão medular de TACR1 (Média \pm SEM; n=6; *
P<0,05, Aumento de 40x.....46

Figura 12: Correlação entre o receptor de neuroquinina-1 e a citocina TNF (A) GPx
(B); P= 0,0013 em correlação TACR1 – TNF e P=0,0008 na correlação TACR1 –
GPx.47

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Quantidade de animais por grupo que desenvolveram ou não neuropatia diabética.....	33
Tabela 2- Anticorpos utilizados com suas respectivas diluições e tempo de incubação com diaminobenzidina (DAB).....	62

LISTA DE ABREVIações, SIMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
10 ⁶	Milhões
ABS	Álcool Absoluto
AGE	Produto final de glicação avançada
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
Cm ²	Centímetro quadrado
COX-2	ciclo oxigenasse - 2
DAG	Diacilglicerol
dL	Decilitro
ERK	Quinase relacionada ao sinal extracelular
FADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
g	Gramas
GlcNac	Uridina 5-difosfato-N-acetilglucosamina
GLUT-2	Transportador de glicose-2
GPx 1/2	Glutationa peroxidase 1/2
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peroxido de Hidrogênio
HIF-1α	Fator indutor de hipóxia 1 alfa
IBA	Molécula Adaptadora Ligante de Cálcio Ionizado-1
iNOS	Óxido nítrico sintase
IP	Intraperitoneal
JNK	Jun N-terminal quinase
Kg	Quilogramas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
Mg	Miligrama
Min	Minuto
Mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de Sódio

NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-κB	Fator nuclear κB
NGF	Fator de crescimento nervoso
NK1	Receptor neurocinina-1
NMDA	N-metil D-aspartato
Nrf-2	Fator nuclear relacionado ao eritroide – 2
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio-1
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKC	Proteína kinase C
PV	Peso vivo
RAGE	Receptor específico de AGE
ROS	Espécie reativas de oxigênio
SDH	sorbitol desidrogenase
SOD	Speróxido desmutase
SP	Substancia P
STZ	Estreptozotocina
TACR1	Receptor de taquicinas-1
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris
TGF-β1	Fator de crescimento transformador β1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSI	Teste de sensibilidade a insula
TTG	Teste de tolerância a glicose
UI	Unidade Internacional
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISAO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Fisiopatologia da neuropatia diabética	20
3.1.1 Via do poliols	20
3.1.2 Via da Hexosamina	21
3.1.3 Via das proteínas kinases C	22
3.1.4 Produtos finais da glicação avançada	22
3.2 Estresse oxidativo na diabetes.....	22
3.3 Processo inflamatório na diabetes.....	24
3.4 Alterações na microcirculação durante a diabetes	25
3.5 Modelo experimental de neuropatia diabética – Estreptozotocina.....	26
3.6 Maropitant	27
4 MATERIAL E METODOS	27
4.1 Animais.....	28
4.1.1 Modelo de neuropatia diabética.....	28
4.1.2 Grupos Experimentais	29
4.2 Limiar mecânico nociceptivo	30
4.3 Imunoistoquímica	30
4.4 Análises Estatísticas.....	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Curva Glicêmica	33
5.2 Teste de tolerância glicose	34
5.3 Teste de sensibilidade à insulina.....	34
5.4 Limiar mecânico nociceptivo	35
5.5 Avaliação da ativação glial e Mediadores inflamatórios	36
5.6 Avaliação sobre o estresse oxidativo na diabetes	41
5.7 Correlação entre o TACR1, TNF α e GPx	47
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	52

REFERENCIAS.....53
ANEXO I - PROTOCOLO DA IMUNOISTOQUÍMICA60

1 INTRODUÇÃO

A federação internacional do diabetes (2019) estima que 425 milhões de pessoas em todo o mundo têm diabetes. Dessas pessoas, com diabetes tipo 1 ou tipo 2, 10 a 26% são acometidas por dor neuropática diabética. Os pacientes comumente apresentam sintomas sensoriais, como parestesias, dormência; alodínia e hiperalgesia. (SCHREIBER et al., 2015).

A hiperglicemia o principal fator para o desenvolvimento e progressão da neuropatia diabética e desencadeia diversos mecanismos metabólicos e vasculares, através da ativação das vias poli-ol, dos produtos finais de glicação avançada, ativação de proteínas kinases e fluxo de hexosamina (FELDMAN et al., 2019; SANDIREDDY et al., 2014), além da ativação das células da microglia levando estimulação e liberação de citocinas inflamatórias (GAGLIARDI, 2003; SANDIREDDY et al., 2014).

A hiperglicemia também exacerba o processo nociceptivo por interferir na função de transporte de elétrons na membrana mitocondrial, reduzir a produção de adenosina trifosfato (ATP) e aumentar a produção de radicais livres (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; SANDIREDDY et al., 2014) Esses elementos produzidos pelo estresse oxidativo e lipoperoxidação intensificam a transmissão da dor e podem provocar morte de mitocôndrias e conseqüentemente dos neurônios (GUEDES, 2007).

No mecanismo de sensibilização central há aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato, substância P que ativam os receptores N-metil D-aspartato (NMDA) e receptor de neurticína-1 (NK1), respectivamente. Acredita-se que a ativação do receptor NK1 potencialize a ação excitatória do NMDA e ativação das células da glia e mantenha a excitabilidade neuronal no corno dorsal da medula (MILLAN, 1999).

A falta de eficácia dos medicamentos utilizados atualmente se dá a complexa fisiopatologia da neuropatia diabética, sendo considerada duas doenças com manifestações clínicas semelhantes (CALLAGHAN; HUR; FELDMAN, 2012). O que acarreta em uma maior dificuldade no seu tratamento. Os medicamentos utilizados para tratamento de dor como opioides e antidepressivos promovem efeitos adversos graves, tolerância e dependência (ANDERSSON et al., 2015). Fazendo com que acarretem em busca por tratamentos alternativos que permita uma melhor

qualidade de vida com mínimos efeitos colaterais. Estudos com o uso de cannabidiol (JESUS et al., 2019) e medicina tradicional chinesa (YANG et al., 2015) são algumas das alternativas que estão sendo estudadas.

O maropitant (CereniaTM; Pfizer Animal Health) é um antagonista seletivo do receptor NK1. Atualmente a sua indicação terapêutica é como antiemético para cães (DE LA PUENTE-REDONDO et al., 2007). Ao bloquear os receptores de substância P, a qual participa do mecanismo de transdução e modulação nociceptiva o maropitant possa fornecer efeito analgésico e promover inibição da ativação microglial no processo de neuropatia, justificando o desenvolvimento e administração de antagonistas para o seu manejo (CORRIGAN et al., 2015).

O estudo mais recente sobre o uso do maropitant como potencial analgésico foi descrito por Tsukamoto et al. (2018), onde o mesmo testou e obteve resultados promissores em modelos de pancreatite aguda. Assim como Corrêa et al. (2019) e SOARES et al. (2021) onde em ambos os estudos se obteve resultados promissores em gatas e cães respectivamente. Tais resultados sugeriram uma ação analgésica deste medicamento, no entanto, ainda não há estudos que demonstrem sua eficiência na modulação da dor crônica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios produzidos pela administração do maropitant em modelo experimental de neuropatia diabética em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Verificar o efeito do maropitant sobre o limiar mecânico nociceptivo de neuropatia causada por diabetes com o auxílio do analgesímetro digital.
- ii. Verificar o efeito do tratamento com maropitant na ativação microglial e na liberação de citocinas inflamatórias na neuropatia diabética.
- iii. Verificar o tratamento com o maropitant sobre os danos oxidativos provocados pela dor.

3 REVISAO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fisiopatologia da neuropatia diabética

A neuropatia diabética é uma alteração metabólica que afeta o sistema somatossensorial do sistema nervoso, tendo como forma mais comum a polineuropatia distal simétrica em que a neuropatia afeta os pés e pernas dos pacientes diabéticos, seguido principalmente pela neuropatia autonômica que irá afetar o coração, sistema gastrointestinal e rins (FELDMAN et al., 2017, 2019; SCHREIBER, 2015).

A neuropatia diabética é primariamente um distúrbio dos nervos sensoriais, nos quais as fibras C são as mais susceptíveis à lesão metabólica. Isso ocorre devido essas fibras não possuírem a bainha de mielina, a qual confere proteção e suporte nutricional comparada as fibras mielinizadas, acarretando em neurodegeneração, afetando principalmente os pés e posteriormente as pernas (FELDMAN et al., 2017; SCHREIBER, 2015; VINCENT et al., 2011).

Os mecanismos fisiopatológicos da neuropatia diabética ainda não estão totalmente esclarecidos sabe-se que a hiperglicemia desencadeia uma cascata de mecanismo através da via polioliol, dos produtos finais de glicação avançada, ativação de proteínas kinases e fluxo de hexosamina promovendo neuroinflamação e estresse oxidativo (FELDMAN et al., 2017, 2019; SANDIREDDY et al., 2014).

3.1.2 Via do polioliol

Durante a ativação da via polioliol a enzima aldose redutase transforma glicose em sorbitol, sendo este oxidado em frutose pela sorbitol desidrogenase (SDH) com dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺) como cofator. Em condições de hiperglicemia, há um aumento no estresse oxidativo resultante diretamente do acúmulo de sorbitol e indiretamente pelo consumo de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), sendo este um cofator para a regulação da glutathiona redutase, gerando uma diminuição na produção e regeneração da glutathiona, levando a lesão devido o estresse gerado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio promovendo uma lesão nos nervos e consequente perda da vasodilatação mediada por oxido nítrico, bem como a um aumento de

produtos finais de glicação avançada (AGEs) (FELDMAN et al., 2017; POP-BUSUI et al., 2016; SANDIREDDY et al., 2014). Além disso, o aumento do fluxo de sorbitol e frutose através da via poliol pode levar a redução da atividade da ATPase (Na^+ / K^+), promovendo a perda da liberação da adenosina trifosfato (ATP), reduzindo a atividade mitocondrial em produzir energia, ocasionando em ruptura e lesão axonal. Associado a via poliol, o estado de hiperglicemia e o aumento da atividade da aldose redutase irá ativar vias de sinalização importante na regulação do estresse oxidativo como a via ativada da proteína kinase C, ciclo oxigenase - 2 (COX-2) e o fator nuclear kB (NF-kB) (ROMÁN-PINTOS et al., 2016; VINCENT et al., 2011).

3.1.3 Via da Hexosamina

Ao tempo em que a via poliol é ativada, o aumento de glicose sanguínea ativa uma outra via importante que pode promover a lesão neuronal. A frutose-6-fosfato, um intermediário da via de glicose, entra na via da hexosamina e sofre uma série de reações para formar a uridina 5-difosfato-N-acetilglucosamina (GlcNac), através da glucosamina-6-fosfato aminotransferase. A GlcNac é uma das responsáveis pelo déficit funcional das células β devido a superexpressão da glutamina e da frutose-6 fosfato amidotransferase que resulta na elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio, o que leva a indução do estresse oxidativo. Além de ser uma das porções de açúcar que se ligam a resíduos de serina/treonina em fatores de transcrição comuns como Sp-1. Este fator de transcrição é responsável por controlar a expressão gênica do fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e é inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) promovendo a disomeostase lipídica, inflamação e lesão de tecidos propensos a complicações, incluindo nervos periféricos, em decorrência do aumento da GlcNac no estado hiperglicêmico da diabetes. (DEWANJEE et al., 2018; FELDMAN et al., 2017a).

O aumento da glicólise também leva ao acúmulo de outro intermediário, dihidroxiacetona fosfato, que é convertido em diacilglicerol (DAG). Aumentos do DAG pode ocasionar a ativação da via das proteínas kinases C (PKC) (FELDMAN et al., 2017a).

3.1.4 Via das proteínas kinases C

Dentre as principais isoformas encontradas nos nervos estão a α , βI , βII , γ , ϵ , e δ , sendo estas dependentes da DAG e do influxo de cálcio para sua ativação, devido a isso em decorrência da elevação do diacilglicerol leva a vários comprometimentos metabólicos que variam da resistência à insulina por interrupção da função da Na / K ATPase, até a alteração da expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator de crescimento transformador β (TGF- β), levando à vasoconstrição, hipóxia, e dano neuronal. (DEWANJEE et al., 2018).

3.1.5 Produtos finais da glicação avançada

A glicação é um processo pelo qual a glicose e outros derivados de sacarídeos sofrem uma reação não enzimática com nucleotídeos de proteínas e lipídeos e resultam na formação de metilglioxal e AGEs. No estado de hiperglicemia os AGEs formam uma espécie de rede com proteínas essenciais, alterando sua função e promovendo danos celulares. Os AGEs se ligam a receptores de superfície celular, principalmente o receptor específico de AGE (RAGE), que ao ser ativado leva a uma cascata de sinalização prejudicial mediada em parte pela ativação do (NF- κ B) levando a vasoconstrição, perda de suporte neurotrófico além de inflamação e apoptose nos nervos (RAMASAMY et al., 2007). Além disso modificam a expressão gênica e a sinalização intracelular promovendo a liberação de moléculas pró-inflamatórias e radicais livres. (FELDMAN et al., 2019). Todos esses fatores são capazes de causar modificações na velocidade de condução (PICKUP & WILLIAMS, 1991).

3.2 Estresse oxidativo na diabetes

Como visto anteriormente a ativação das vias já citadas induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A elevação das espécies de oxigênio e nitrogênio poder causar danos aos lipídios das estruturas mielinizadas dos nervos, levando a danos na de microcirculação do sistema nervoso central (STAVNIICHUK

et al., 2014). O estresse oxidativo / nitrosativo neuronal também pode ativar várias quinases, como PKC, proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), jun N-terminal quinase (JNK) e fatores de transcrição redox-sensíveis, incluindo NF- κ B, produzindo um loop que pode ocasionar em danos a estruturas mielinizadas dos nervos, levando a morte dessas células (VICENT et al., 2004).

Através da fosforilação oxidativa ocorre o transporte de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($FADH_2$) na mitocôndria através dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons para a produção de ATP, um dos subprodutos da fosforilação oxidativa é a produção de baixos níveis de ROS que são facilmente neutralizados por antioxidantes celulares inatos, como superóxido desmutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). No entanto, durante sobrecarga de glicose, como na diabetes, ocorre uma falha na fosforilação oxidativa, levando à perda de produção de ATP e aumento dos níveis de ROS, e de peróxido de hidrogênio que está principalmente envolvido na gênese da neuropatia diabética, além do envolvimento do radical superóxido, do radical hidroxila e espécies reativas de nitrogênio, o que subsequentemente leva à insuficiência mitocondrial e dano metabólico e oxidativo das células de Schwann e neurônios DRG. (FELDMAN et al., 2017a).

Além da redução de ATP gerada pela sobrecarga induzida pela hiperglicemia, o estresse oxidativo rompe o potencial de membrana da mitocôndria, fazendo com que a tenha um aumento da permeabilidade mitocondrial, alterando a regulação das proteínas do grupo Bcl-2. Assim uma redução nos níveis de Bcl-2 na neuropatia diabética promove uma movimentação do citocromo C para o citoplasma e ativação do apoptose via estimulação das caspase-3. Em seu estado normal, o processo de fissão e fusão das mitocôndrias permanece em equilíbrio, no entanto, durante o estresse, Drp1 se move do citoplasma para a mitocôndria, que por sua vez inicia a quebra de sua membrana promovendo morte mitocondrial (DEWANJEE et al., 2018; ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004; FERNYHOUGH, 2015).

Juntamente a esses processos, durante o estado de diabetes a sobrecarga da glicose que é utilizada como substrato pelas células nervosas, sobrecarrega o transporte das moléculas de acetil-CoA sendo então convertidas em acilcarnitinas. O acúmulo de acilcarnitinas é tóxico para as células de Schwann e para os neurônios do gânglio dorsal da medula, promovendo lesão e destruição dessas

células. As acilcarnitinas acumuladas são liberadas das células de Schwann e podem induzir degeneração axonal o que é associada a uma redução na velocidade de condução nervosa (SANDIREDDY et al., 2014).

3.3 Processo inflamatório na diabetes

Assim como no estresse oxidativo, a geração do processo inflamatório na diabetes está ligada ao estado de hiperglicemia e a ativação das vias poli-ol, hexosamina e o principalmente o acúmulo de produtos de glicação avançada (POP-BUSUI et al., 2016).

O acúmulo de produtos AGE estimula a geração de mediadores inflamatórios e a ativação do fator de transcrição NF- κ B, um potente indutor de processos inflamatórios, atuando em vários receptores presentes na microglia. Os macrófagos estimulam a produção de citocinas como IL1, IL6, IL17, TNF α , proteína quimioatraente-1, proteína C reativa e quimiocinas como CCL-2 e CXCL. A ativação do RAGE pode induzir uma cascata inflamatória por meio da ativação da via do NF- κ B, no qual vai regular positivamente a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias sendo também responsável pela indução do apoptose neuronal. A ativação de NF κ B também irá suprimir a expressão de genes antioxidantes ao reduzir a ativação da via do Nrf-2 e, assim, indiretamente, enfraquecendo a defesa antioxidante inata (DEWANJEE et al., 2018; FELDMAN et al., 2019; SLOAN et al., 2018).

A inflamação induzida por hiperglicemia afeta as características estruturais dos neurônios, a glicação das proteínas presente na bainha de mielina altera sua antigenicidade, causando infiltração de monócitos, macrófagos, neutrófilos da circulação sanguínea e ativando as células gliais do sistema nervoso. Os monócitos e células imunes estimulados têm um ciclo vicioso para aumentar a produção de mediadores inflamatórios, potencializando assim o dano nos nervos. As citocinas como IL1, IL6 e IL17 irão sensibilizar os receptores periféricos causando dor neuropática. Além disso, a neuroinflamação leva a danos nos nervos devido à apoptose induzido por sinalização MAPK (POP-BUSUI et al., 2016; SANDIREDDY et al., 2014).

O TNF- α também promove a expressão de moléculas de adesão celular que são capazes de diminuir a taxa de perfusão sanguínea e, assim, diminuir o

suporte neurotrófico. Foi demonstrado que as quimocinas liberadas produzem hiperalgesia por meio da ativação dos receptores de quimocinas presentes nos nervos. A hipóxia e a isquemia criadas no diabetes também agravam a neuroinflamação por meio da indução do óxido nítrico sintase (iNOS), que libera NO, um mediador fisiológico da inflamação (CALCUTT, 2002; RISTIKJ-STOMNAROSKA; RISTESKA-NEJASHMIKJ; PAPAZOVA, 2019; SANDIREDDY et al., 2014). A ativação da cascata inflamatória e o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias associadas as vias de comunicação neuroimune desempenham um papel fundamental que irá levar ao dano estrutural e funcional dos nervos periféricos, levando à neuropatia periférica diabética.

3.4 Alterações na microcirculação durante a diabetes

A alteração na microcirculação de pacientes diabéticos está associada a danos vasculares estando ligada em parte ao equilíbrio entre o estresse oxidativo e o sistema de óxido nítrico, bem como no aumento de moléculas de adesão, como moléculas de adesão intercelular (ICAM) -1 e moléculas de adesão de células vasculares (VCAM) -1. Em indivíduos diabéticos, ICAM e VCAM estão associados a marcadores de inflamação, como a proteína C reativa (PCR), interleucina (IL) -6 e fator de necrose tumoral (TNF) α (SCHRAM et al., 2003).

Em decorrência do estresse oxidativo e do aumento da liberação de moléculas de adesão e inflamatórias no estado da diabetes há também uma diminuição dos mediadores da formação de vasos sanguíneos, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento nervoso (NGF) e angiopoietinas, gerando um aumento na permeabilidade desses vasos o que leva a um exacerbamento de agentes inflamatórios para fora desses vasos, o que pode levar a neuropatia. (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004; FELDMAN et al., 2019).

3.5 Modelo experimental de neuropatia diabética – Estreptozotocina

A utilização de modelos animais é uma ferramenta de grande importância para a compreensão da fisiopatologia de doenças. Para estudo do diabetes apresentam-se como uma ferramenta fundamental para a melhor compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento da doença, assim como de suas complicações, incluindo a neuropatia diabética. Assim modelos experimentais de neuropatia diabética visam induzir as principais alterações comportamentais, tais como hiperalgesia, alodinia, formigamento.

De acordo com a literatura, o diabetes experimental pode ser induzido em animais por vários mecanismos dentre eles: remoção do pâncreas total ou parcial (pancreatectomia), lesão no sistema nervoso central, dietas ricas em açúcares, má nutrição in útero ou altas doses de hormônios contra-regulatórios como os glicocorticoides (DELFINO et al., 2002). Entretanto, o método mais utilizado é a indução de diabetes por meio de substâncias químicas citotóxicas, como a estreptozotocina e a aloxana (RADENKOVIĆ et al., 2016).

A estreptozotocina é um agente antimicrobiano isolada do *Streptomyces achromogenes* efetiva contra organismos gram-positivos e gram-negativos. A dose de até 200 mg/kg/PV induz a diabetes em camundongos após três dias da aplicação (FURMAN, 2015).

A estreptozotocina é um composto hidrofílico que pode ser classificado como análogo de glicose tóxicos para células beta (SZKUDELSKI et al., 2001). Assim como a aloxana, a sua entrada nas células beta também ocorre por meio do transportador GLUT-2 (SATO et al., 2006). Com isso ocorre a destruição dessas células e interrupção da produção de insulina.

A sua ação diabetogênica acontece devido aos seguintes mecanismos: alquilação do DNA, liberação de óxido nítrico a partir do grupo nitrosureia e geração de ROS, levando necrose das células beta pancreáticas. Além disso, a glicosilação e alquilação de proteínas são fatores que complementam a ação tóxica do fármaco (LENZEN, 2008; ISLAM et al., 2017).

3.6 Maropitant

Atualmente, o tratamento da neuropática diabética é feita com antidepressivos, antiepiléticos tricíclicos e analgésicos opióides (ANDERSSON et al., 2015). Porém, mesmo utilizando esses medicamentos, estudos mostram que apenas um terço dos pacientes obtém alívio da dor superior a 50% (JAVED et al., 2015). A falta de eficácia dos medicamentos pode ser devido a complexa fisiopatologia da neuropatia diabética.

O citrato de maropitant é um antagonista seletivo dos receptores da neurocinina-1 (NK1), esses receptores são expressos em neurônios dorsais da medula espinhal e bloqueiam a ação da substância P no sistema nervoso central e periférico, sendo comumente eficaz e seguro na prevenção da emese em cães (PUENTE-REDONDO et al., 2007; SEDLACEK et al., 2008).

A substância P atua como um neurotransmissor e como um neuromodulador associado ao processo inflamatório e à dor (LIN et al., 2012). Na sensibilização central há aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato, substância P que ativam os receptores NMDA e NK1, respectivamente. Acredita-se que a ativação do receptor NK1 potencialize a ação excitatória do NMDA e ativação das células da glia e mantenha a excitabilidade neuronal no corno dorsal da medula (MILLAN, 1999).

Pesquisas tem sido realizada para verificar a atividade analgésica desse medicamento como em ratos (KARNA et al, 2019; AGUADO et al, 2015; LAIRD et al., 2000), cobaias (RUGGIERI et al., 2000), coelhos (OKANO, et al., 2001), cães (BOSCAN, 2011; ALVILLAR et al., 2011; SOARES et al., 2021) e gatos. (CORRÊA et al., 2019) Dessa forma, seu uso em associações anestésicas pode ser uma opção terapêutica por incluir efeitos antiêméticos e analgésicos, especialmente em associação com os medicamentos já conhecidos no tratamento da neuropatia diabética como os opioides.

Além disso, o estudo sobre o uso do maropitant como potencial efeito anti-inflamatório foi descrito por Tsukamoto et al. (2018), onde o mesmo testou e obteve resultados promissores em modelos de pancreatite aguda. Esses resultados sugerem uma ação analgésica do medicamento na dor aguda, no entanto, ainda são necessários mais estudos que demonstrem sua eficiência na modulação da dor crônica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil, protocolo 017/2019.

Foram utilizados 75 animais com peso entre 25 e 35g e ficaram mantidos em caixas de polipropileno de 1500 cm² forradas com maravalha em ambiente com temperatura controlada (22° C) e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), recebendo ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a um período de adaptação pré experimental durante uma semana com o intuito de equalizar todas as condições ambientais e alimentares de modo a não interferir nos resultados da pesquisa.

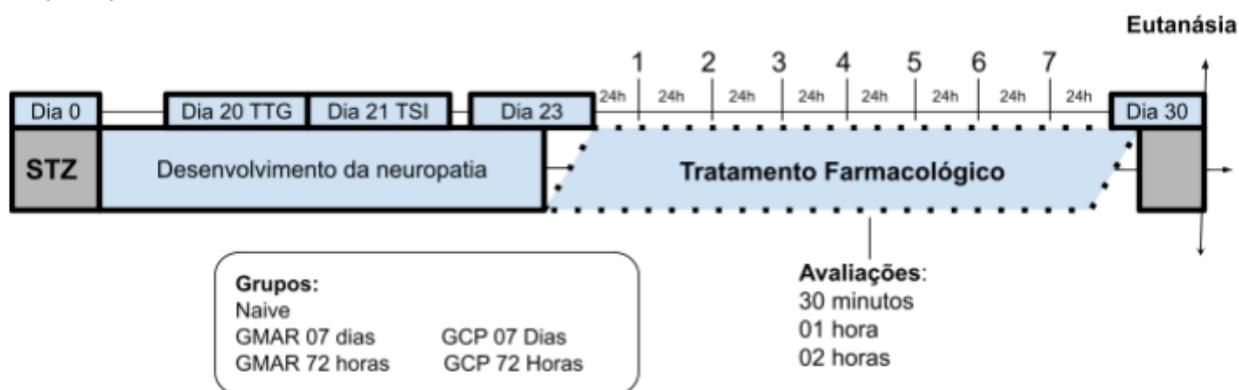


Figura 1: Esquema geral do modelo experimental

4.1.2 Modelo de neuropatia diabética

A indução da neuropatia diabética foi realizada através da administração em dose única da estreptozotocina na dose de 160 mg/kg. (GRAHAM. et al, 2011). Após pesagem dos animais, foi realizada glicemia em jejum de 04 horas e administrado estreptozotocina diluída em tampão citrato (0,1 M; pH 4,5), via peritoneal. Após um período de sete dias foi realizado o teste de glicemia para confirmação da indução de hiperglicemia nos animais dos grupos tratados. A curva glicêmica foi realizada durante um total de 21 dias para o acompanhamento e evolução da diabetes (Figura 2). Para os animais que apresentaram glicemia acima dos 300mg/dl foram considerados diabéticos.

Para a comprovação do modelo de diabetes através do uso da

estreptozotocina foi realizado no 20º dia o teste de tolerância a glicose e no 21º o teste de sensibilidade a insulina. O teste de tolerância a glicose foi realizado a medição da glicose basal (jejum de 6 h) e logo em seguida foi feita a administração de 2g de glicose/kg de uma solução de glicose a 20%. A glicemia foi mensurada aos 30, 60 e 120 minutos (Figura 3). No teste utilizado para a constatação do modelo de diabetes foi o da sensibilidade à insulina. Os animais permaneceram em jejum durante 01 hora e foi realizado a medição da glicose basal em seguida foi administrado 0,75 UI/kg de insulina regular. A glicemia foi mensurada aos 15, 30 e 60 minutos (figura 4).

4.1.3 Grupos Experimentais

Após a mensuração dos valores basais referentes a estímulos mecânicos, seguida da indução da diabetes, o desenvolvimento da neuropatia foi confirmado após 21 dias com o auxílio do analgesímetro digital. Após confirmação da neuropatia estabelecida.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 05 grupos (n=15)

- Grupo Controle negativo (GC) - Os animais não foram submetidos aos tratamentos e/ou administração da estreptozotocina;
- Grupo Maropitant 72 horas – animais com neuropatia diabética que receberam 30mg/kg/IP/24q de maropitant durante 72 horas;
- Grupo Maropitant 07 dias – animais com neuropatia diabética que receberam 30 mg/kg/IP/24q de maropitant durante 07 dias;
- Grupo controle positivo 72 horas - animais com neuropatia diabética que receberam 0,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) durante 72 horas;
- Grupo controle positivo 07 dias - animais com neuropatia diabética que receberam 0,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) durante 07 dias.

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, por sobredose de 150 mg/kg de propofol, a medula foi coletada através do método asséptico por meio de hidropulsão descrita por Moghaddasi et al. (2007) e um fragmento medular de 4 mm da região lombossacral para análise de imunistoquímica.

4.2 Limiar mecânico nociceptivo

A avaliação do limiar na pata dos camundongos foi feita pelo método de pressão crescente descrita por Cunha et al. (2004) no período de adaptação experimental para determinação do limiar basal dos animais. Durante o desenvolvimento do modelo de neuropatia diabética os animais foram avaliados aos sete, 14 e 21 dias após a administração da estreptozotocina. O membro posterior direito foi escolhido para verificação.

O analgesímetro digital é um aparelho composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo junto a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas (0,1 - 1000g). Ao transdutor é adaptada uma ponteira Universal Tips10 μ L (T-300, Axygen), que estimula diretamente a pata do animal. O teste consistiu do experimentador aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual provocou uma resposta de flexão característica. A pressão registrada no aparelho no momento do reflexo do animal foi considerada como o limiar mecânico nociceptivo.

Durante as avaliações, os animais foram mantidos em caixas de MDF independentes, com abertura superior e piso em tela aramada de inox de 1 mm de diâmetro. Antes da avaliação, os animais permaneceram nas caixas por trinta minutos para a adaptação. A sensibilidade mecânica foi obtida pela média de pelo menos cinco medidas de cada pata, realizadas com intervalos de aproximadamente 5 minutos.

4.3 Imunoistoquímica

A medula espinal foi fixada em paraformaldeído a 4% onde ficou por 24 horas e em seguida sendo armazenada em álcool 70%. O tecido é desidratado em volumes crescentes de álcool 80%, 90% e absoluto, após a desidratação foi feita a submersão em xilol e colocados em cassetes específicos com parafina para a emblocagem. Após esse procedimento são realizados cortes histológicos de 03 micrometros de espessura com o auxílio de micrótomo, os quais foram montados em laminas gelatinizadas.

As amostras foram submetidas à análise imunoistoquímica pela técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp.,

Fremont, CA, USA). Os cortes histológicos sofreram desparafinização em xilol puro, hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 80% e 70%) e posteriormente lavados com água corrente, após a hidratação, a recuperação antigênica decorreu em calor pelo banho-maria a 96°C, usando solução de ácido cítrico (pH 6,0), os cortes ficaram em banho maria durante 20 minutos e em temperatura ambiente por mais 20 minutos. Após esse período os cortes passaram por um processo de lavagem em tampão TBS. As secções histológicas passaram por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA) e foram incubadas em câmara úmida overnight com o anticorpo primário. Após esse período os cortes passaram por uma nova lavagem em tampão TBS e o anticorpo secundário foi incubado permanecendo durante 45 minutos, em câmara úmida em temperatura ambiente, passado esse tempo é realizada uma nova lavagem em tampão TBS e posterior incubação da estreptavidina por 30 minutos também permanecendo em temperatura ambiente na câmara úmida. O cromógeno utilizado será a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA). Foram avaliados os anticorpos para avaliação glial, citocinas da cascata inflamatória e do estresse oxidativos anti-IBA1, anti-TNF α , anti-IL10, anti-TACR1, anti-HIF-1 α , anti-GPx1/2.

Foi realizada uma avaliação quantitativa da expressão imunoistoquímica de dos anticorpos anti-TNF α , anti-GPx1/2, anti-IL10, anti-TACR1, anti-HIF-1 α na medula em seis animais/grupo e determinada a área de imunomarcção utilizando o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA) as análises foram realizadas por todo o campo da medular separados em: corno dorsal, corno ventral e região central medular. Imagens da medula espinhal foram fotografadas em microscópio (Leica DM 2500) utilizando a câmera digital (Leica DFC 295) (Leica Microsystems, Germany). Para avaliar o efeito do maropitant sobre o mecanismo de ativação glial, foi feita a contagem de células positivas para o anticorpo anti-IBA-1. Para a análise dos demais anticorpos, “color deconvolution” e “thresholding” das imagens foram realizadas. Os dados foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcção em pixels (SILVA, 2014).

4.4 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o Graph Pad Prism Software versão 8.02. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados do limiar nociceptivo mecânico foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Os dados da imunohistoquímica foram analisados verificando a normalidade dos resíduos pelo teste *Bartlett's*. Os dados então foram submetidos a análise paramétrica e para comparação dos grupos foi utilizado o teste de Newman-Keuls. Para análise de correlação os dados dos anticorpos TACR1, TNF α e GPx 1/2 foram analisados através da correlação Pearson. Foi adotado nível de significância 5%.

5 RESULTADOS

O modelo experimental de diabetes promoveu neuropatia em 49 animais (81,6%) estudados ao longo dos 21 dias após a administração da estreptozotocina (Tabela 1)

Tabela 1:Quantidade de animais por grupo que desenvolveram ou não neuropatia diabética

Grupos	Neuropatia	Sem neuropatia
Controle positivo 72 horas	13	2
Controle positivo 07 dias	11	4
Maropitant 72 horas	12	3
Maropitant 07 dias	13	2

5.1 Curva Glicêmica

O acompanhamento da curva de glicêmica constatou que o agente estreptozotocina foi capaz de elevar a glicose sanguínea no sétimo dia. Com valores medios entre 350-400 mg/dL.

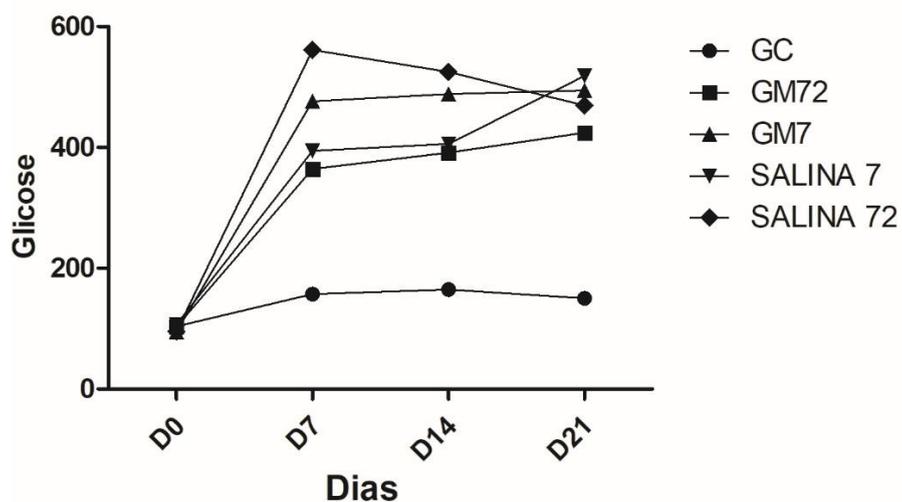


Figura 2:Curva glicêmica após administração de estreptozotocina nos, maropitant 72 horas (GM72), maropitant 07 dias (GM7) e solução salina 07 dias e 72 horas e grupo controle (GC)

5.2 Teste de tolerância glicose

Em relação ao teste de tolerância a glicose, os grupos que receberam estreptozotocina apresentaram elevado valor de glicose devido à falta de insulina promovida pelo agente, enquanto o grupo controle se manteve estável durante o teste.

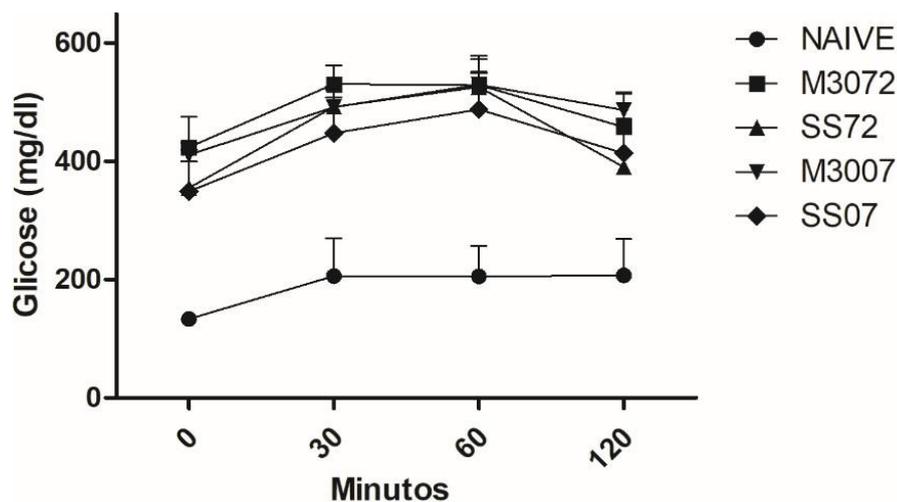


Figura 3: Curva glicêmica do teste de tolerância a glicose dos grupos controle (GC), maropitant 72 horas (GM3072), maropitant 07 dias (GM3007) e solução salina 07 dias, (SS07) e 72 horas (SS72).

5.3 Teste de sensibilidade à insulina

O grupo solução salina 72 horas (SS72), apresentou pico de decréscimo em torno de 200 mg/dL aos 30 minutos. Enquanto os demais apresentaram a curva em níveis basais, com pico de decréscimo em torno de 60 mg/dL aos 30 min. Todos os grupos apresentaram recuperação a partir dos 60 minutos após a administração da insulina.

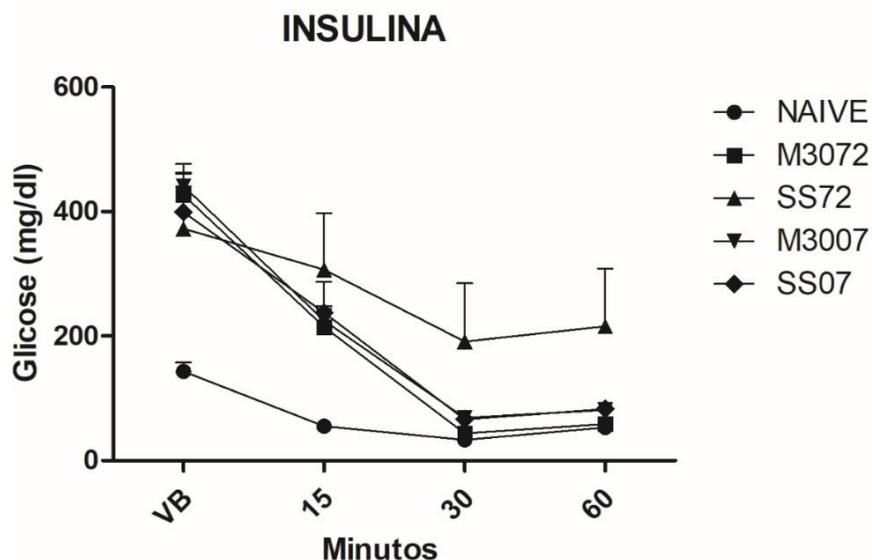


Figura 4: Curva glicêmica do teste de sensibilidade à insulina dos grupos controle (GC), maropitant 72 horas (GM72), maropitant 07 dias (GM7) e solução salina 07 dias, (SS07) e 72 horas (SS72).

5.4 Limiar mecânico nociceptivo

O estado de hiperglicemia induzida pela estreptozotocina resultou no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, demonstrada pela redução do limiar nociceptivo após um período de 21 dias decorridos da administração do agente diabetogênico em todos os animais, exceto no grupo controle. A dose administrada de 30 mg/kg/24q de maropitant se mostrou eficaz a partir dos primeiros 30 minutos em comparação ao grupo que só recebeu a solução salina, não havendo diferença em comparação aos outros momentos após a administração do maropitant ($p < 0,0001$) (Figura 5A - C).

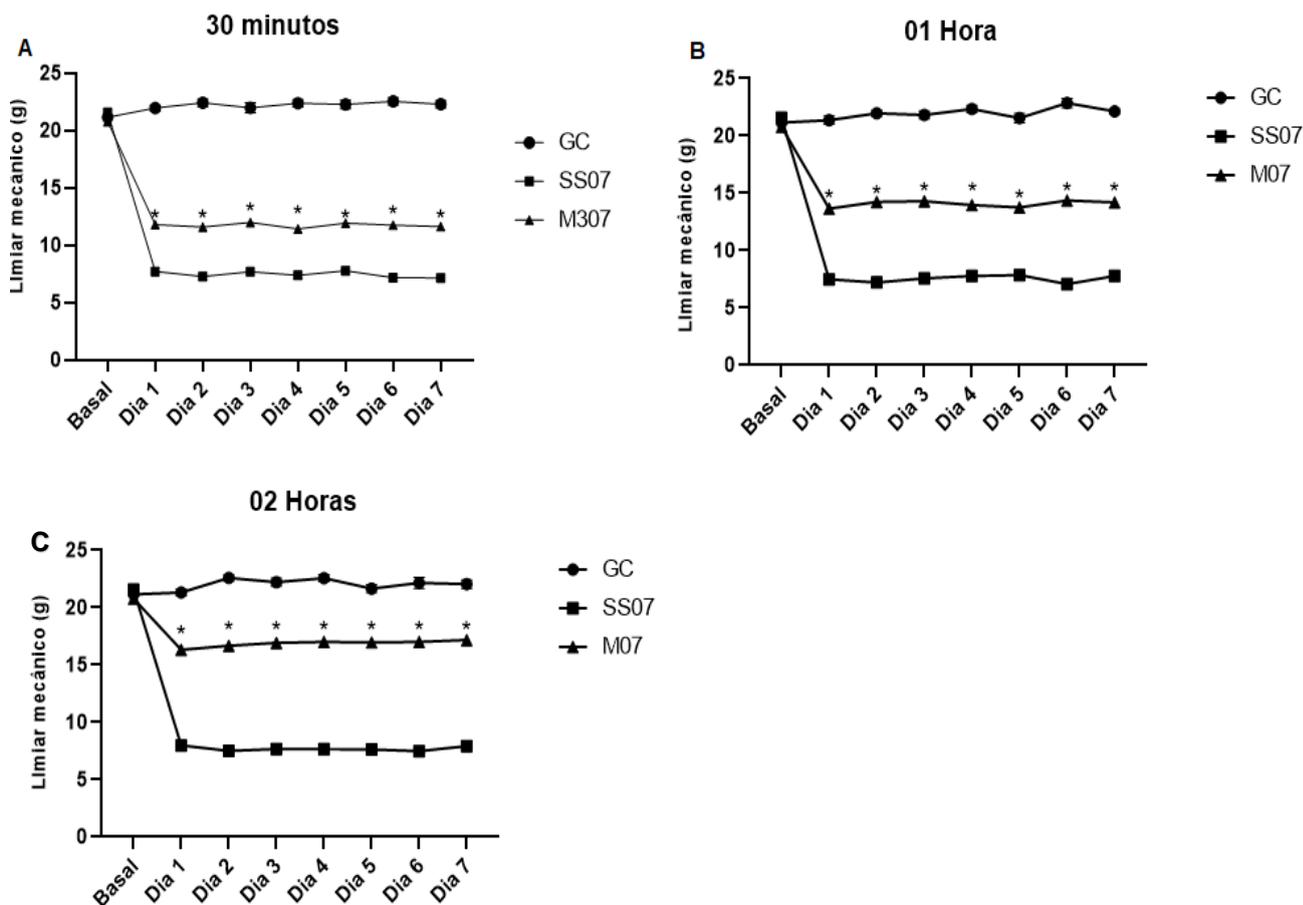


Figura 5: Limiar nociceptivo mecânico dos grupos controle (GC), maropitant (M307) e solução salina (SS07) após administração de maropitant e solução salina nos tempos de 30 min (A), 1 hora (B) E 2 horas (C) durante sete dias de administração. Valores representam média \pm EPM. * $p < 0,0001$ comparado ao SS07.

5.5 Avaliação da ativação glial e Mediadores inflamatórios

A marcação de células positivas para IBA-1 estava presente em todos os grupos experimentais (Figura 5 A - D), visto que a ativação das células microgliais estão presentes em condições fisiológicas normais no organismo animal, podendo ter sua atividade exacerbada em processos patológicos.

No grupo controle positivo 72 horas (Figura 6 C) foi observado um aumento significativo ($P < 0,05$) das células imunopositivas em comparação ao grupo maropitant 72 horas (Figura 6 D), indicando um possível efeito do maropitant na redução da atividade glial já no início do tratamento. Durante o decorrer do tratamento, a ação na atividade glial se tornou mais pronunciada, a redução foi

significativa ($P = 0,0001$) entre os grupos maropitant 07 dias (Figura 6 B) e o grupo controle positivo 07 dias (Figura 6 A).

Em relação ao $\text{TNF-}\alpha$, o grupo maropitant 07 dias (Figura 7 B), se mostrou significativamente eficaz ($P = 0,0001$) na redução desta citocina em comparação com o grupo controle positivo (Figura 7 A), indicando um possível efeito antiinflamatório do maropitant durante a neuropatia diabética.

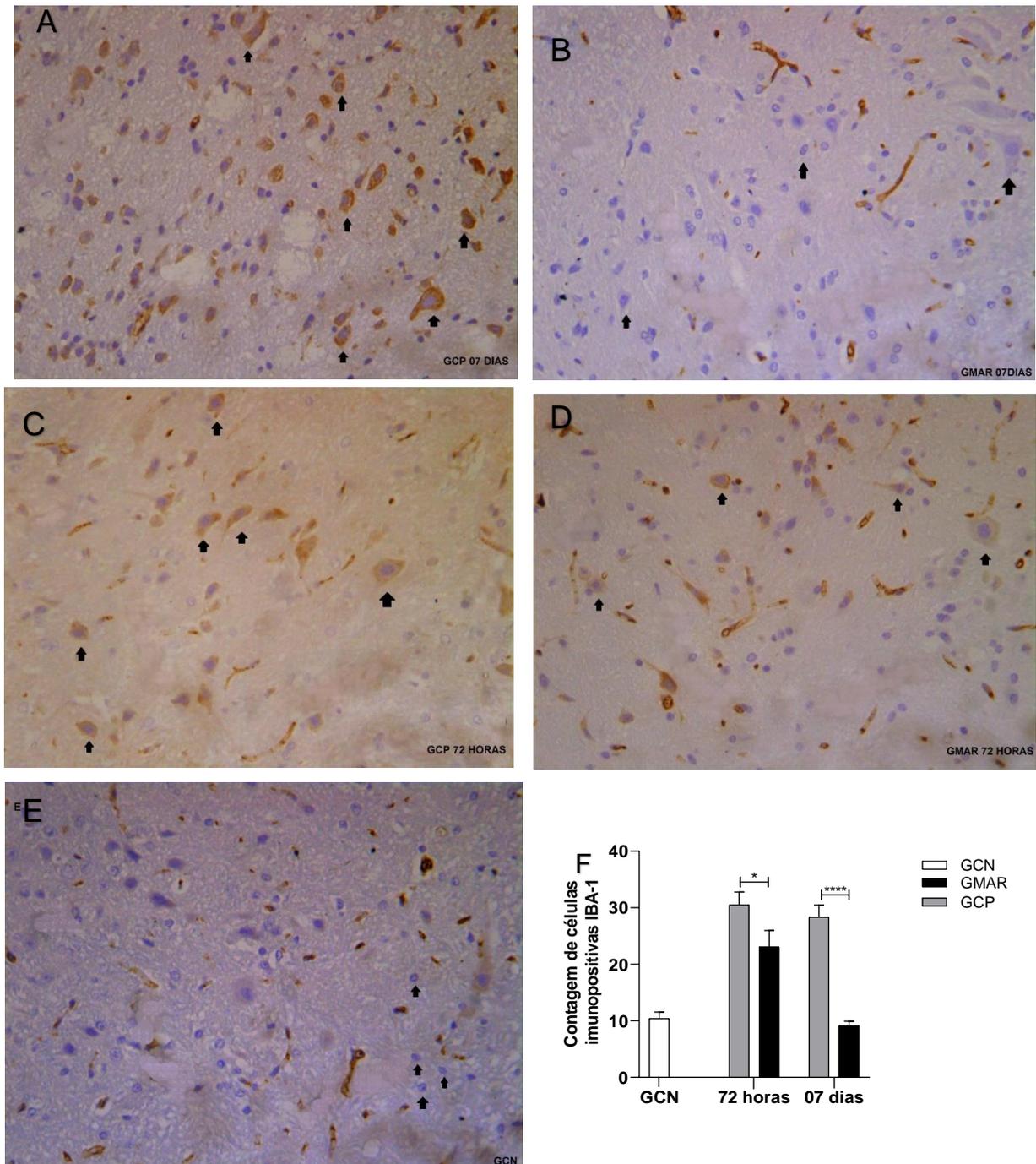


Figura 6: Contagem de células imunopositivas de IBA-1 na medula espinal de camundongos. (A-E) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de IBA-1 em (A) Grupo controle positivo 07 dias; (B) Grupo maropitant 30 mg 07 dias; (C) Grupo controle positivo 72 horas, (D) Grupo maropitant 30 mg 72 horas e (E) Grupo controle negativo (GC). (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). (F) Contagem de células imunopositivas medular de IBA- 1 (Média \pm SEM; n=6; *P < 0,05; ****P < 0,0001). Aumento de 40x.

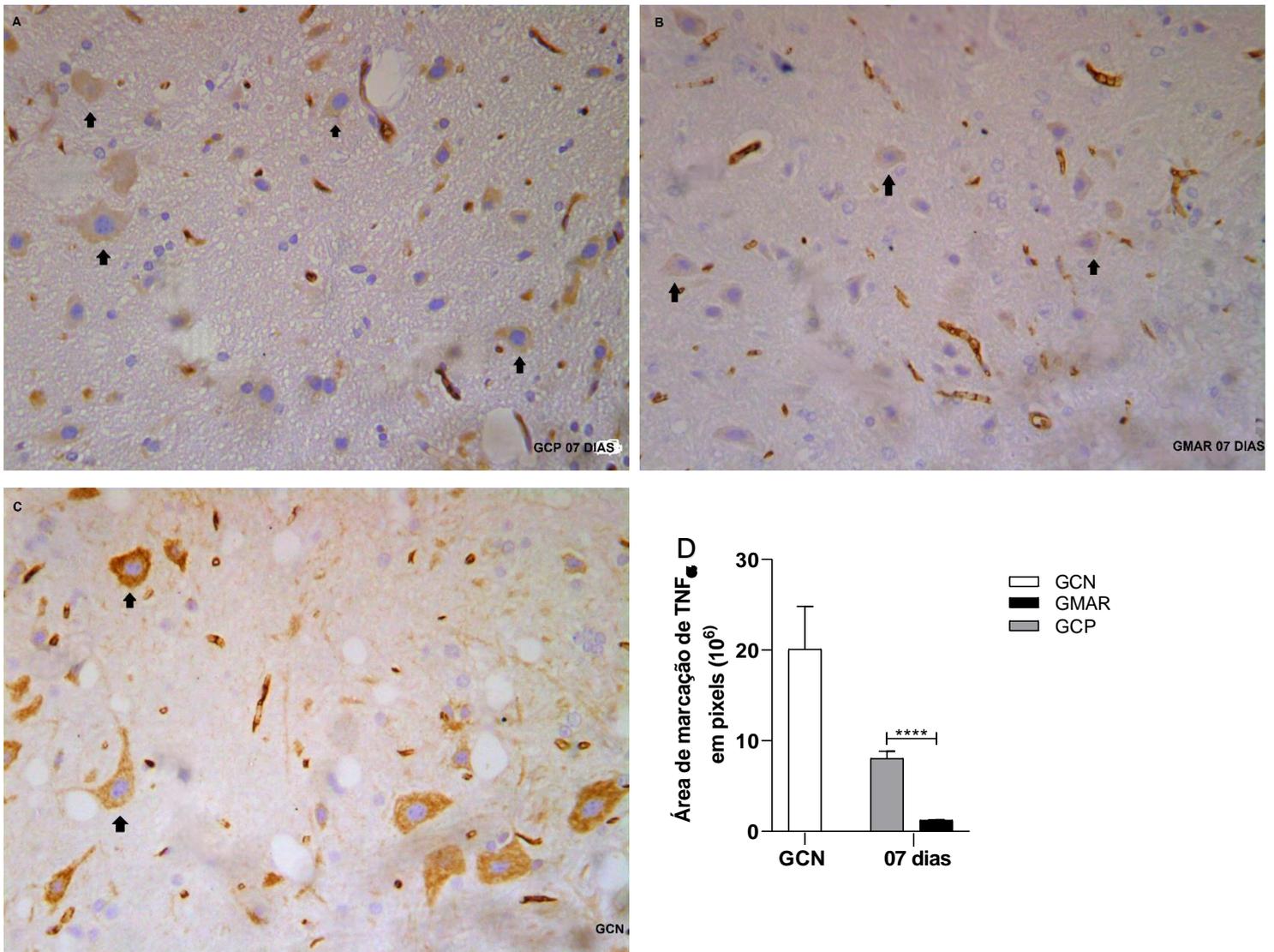


Figura 7: Expressão proteica de TNF- α na medula espinal de camundongos. (A-C) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de TNF- α em (A) Grupo controle positivo 07 dias; (B) Grupo maropitant 30 mg 07 dias; (C) Grupo controle negativo (GC). (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). (D) Área de imunomarcação em pixels da expressão medular de TNF- α (Média \pm SEM; n=6; ****P < 0,0001). Aumento de 40x.

Foi observado um aumento significativo da expressão de IL10 na medula de animais que receberam o maropitant 07 dias ($P < 0,001$) (Figura 8 D) em comparação ao observado nos animais do grupo controle positivo de 07 dias (Figura 8 C), indicando um efeito antiinflamatório com uso contínuo do maropitant, visto que a expressão se manteve aumentada desde o início do tratamento.

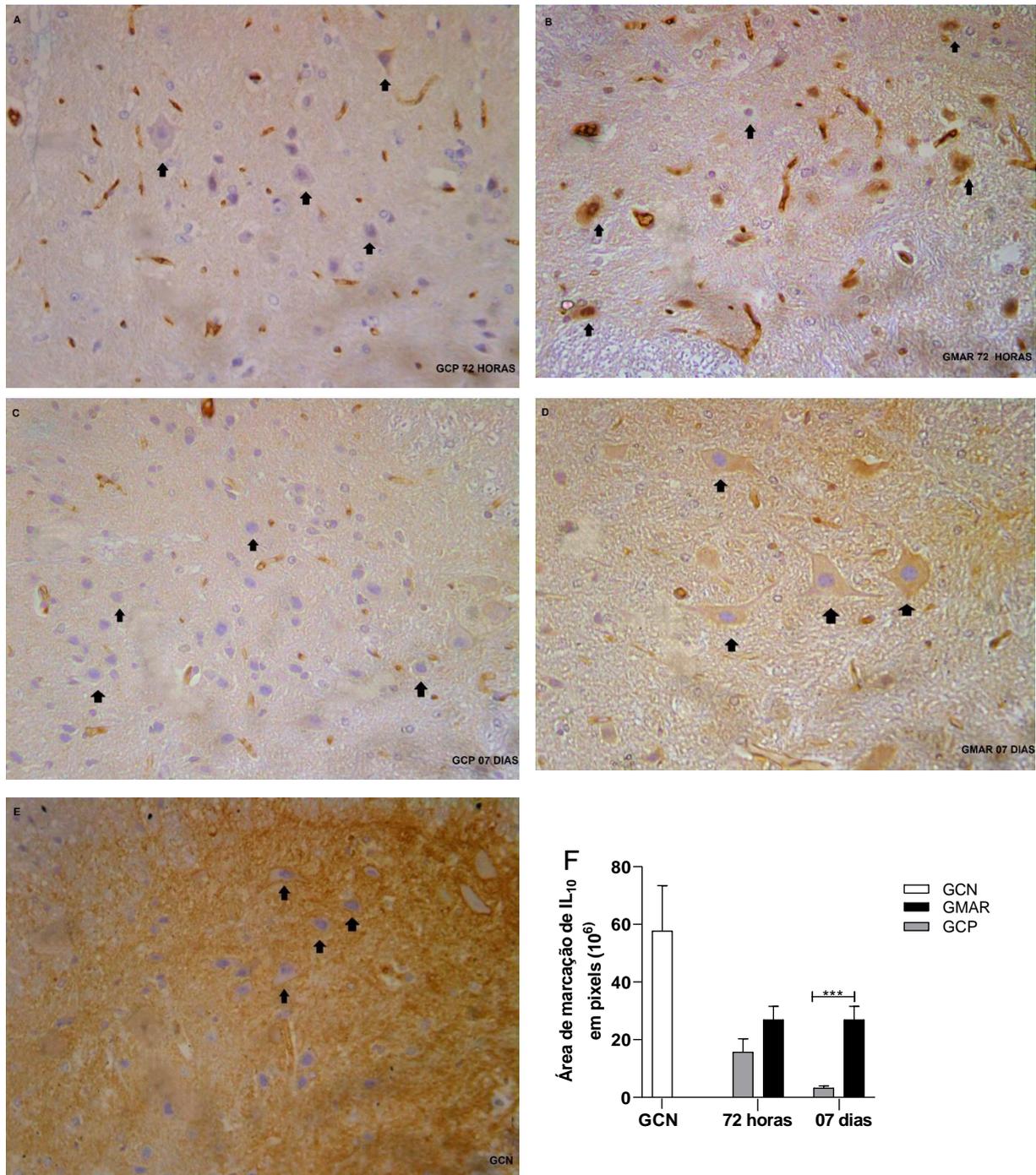


Figura 8: Expressão proteica de IL10 na medula espinal de camundongos. (A-E) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de IL10 em (A) Grupo controle positivo 72 horas; (B) Grupo maropitant 30 mg 72 horas; (C) Grupo controle positivo 07 dias; (D) Grupo Maropitant 07 dias; (E) Grupo controle negativo. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). F) Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de IL10 (Média \pm SEM; n=6; ***P < 0,001); Aumento de 40x.

5.6 Avaliação sobre o estresse oxidativo na diabetes

No grupo controle positivo 72 horas (Figura 10 A) a GPx teve uma redução na expressão do GPx, após 72 horas do tratamento, o grupo maropitant 72 horas (Figura 10 B) apresentou um aumento significativo ($P=0,001$) em comparação como grupo do controle positivo 72 horas. Em relação ao grupo maropitant 07 dias (Figura 10 D) o aumento se manteve significativo ($P=0,0001$) em comparação ao grupo controle positivo 07 dias (Figura 10 C), indicando um possível efeito antioxidante do maropitant na neuropatia diabética.

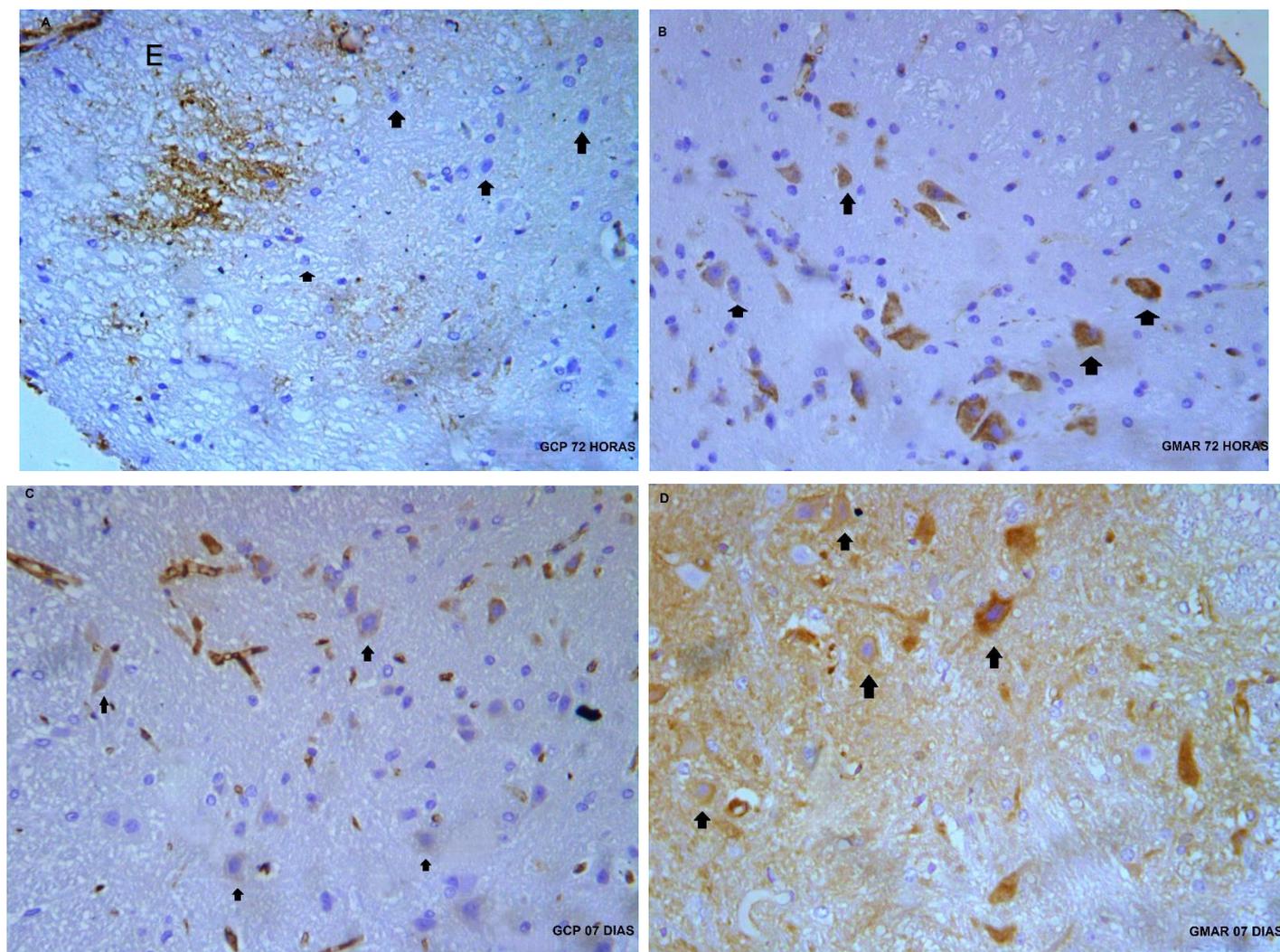


Figura 9: Área de expressão do GPx 1/2 na medula espinal de camundongos. (A-D) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de GPx 1/2 em (A) Grupo controle positivo 72 horas; (B) Grupo maropitant 30 mg 72 horas; (C) Grupo controle positivo 07 dias; (D) Grupo Maropitant 07 dias. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). (E) Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de GPx 1/2 (Média \pm SEM; n=6; ***P < 0,001 ****P < 0,0001); Aumento de 40x.

O HIF-1 α medeia respostas adaptativas ao estresse oxidativo e observa-se uma redução da expressão nos grupos controle positivo 72 horas (Figura 11 A) e grupo controle positivo 07 dias (Figura C). Com o uso do maropitant houve um aumento significativo aos 07 dias (Figura 11 D), em relação ao grupo de solução salina 07 dias (P=0,0001).

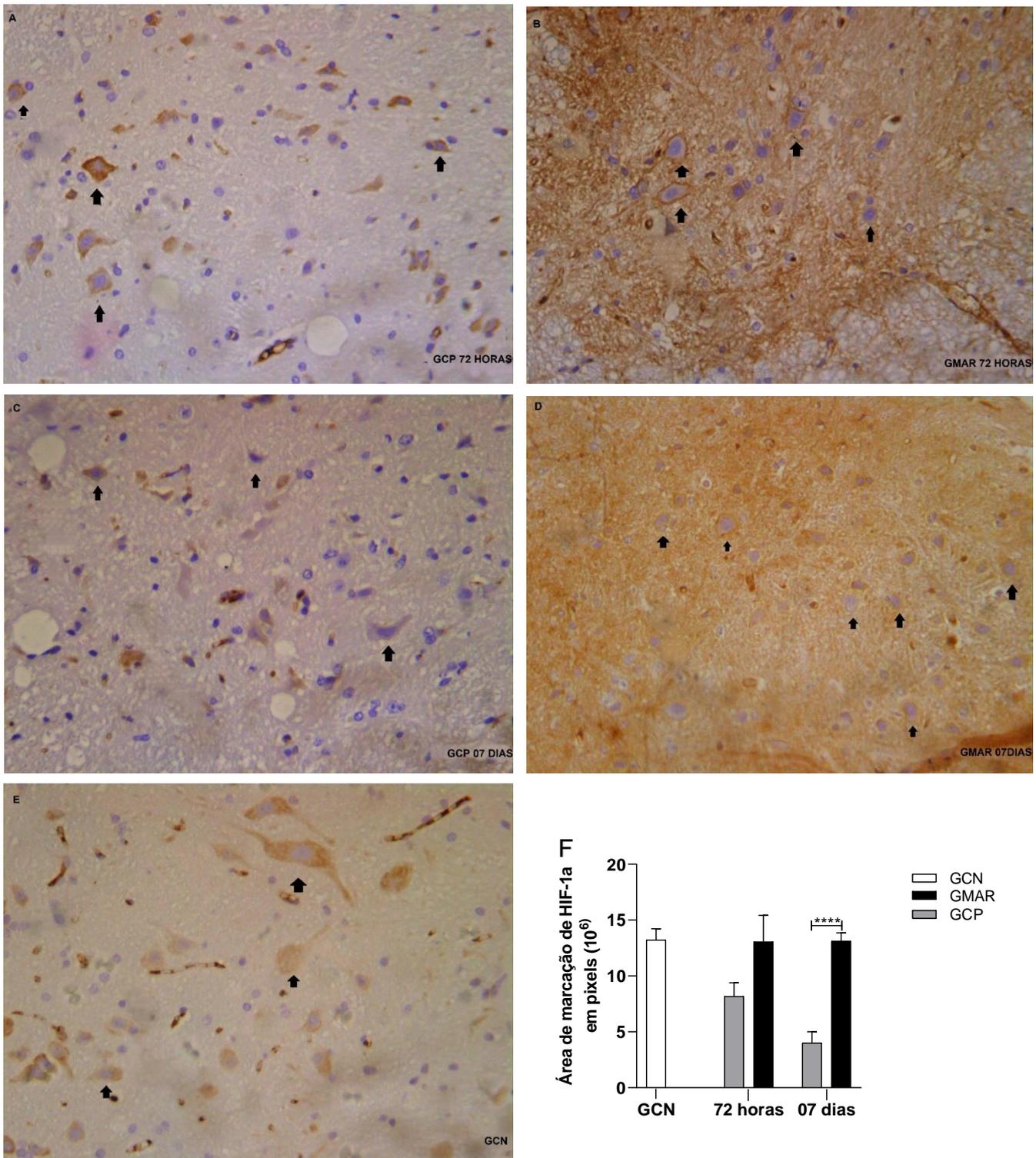


Figura 10: Área de expressão do HIF-1 α na medula espinal de camundongos. (A-E) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de HIF-1 α em (A) Grupo controle positivo 72 horas; (B) Grupo maropitant 30 mg 72 horas; (C) Grupo controle positivo 07 dias; (D) Grupo Maropitant 07 dias; (E) Grupo controle negativo (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). F) Área de imunomarcação em pixels da expressão medular de HIF (Média \pm SEM; n=6); ****P<0,0001; Aumento de 40x.

Em relação a TACR1, observou-se que o maropitant foi efetivo na redução significativa na área de expressão do receptor ($P=0,0498$) no grupo maropitant 07 dias (Figura 9 D) em comparação com o grupo controle positivo 07 dias. (Figura 9 C).

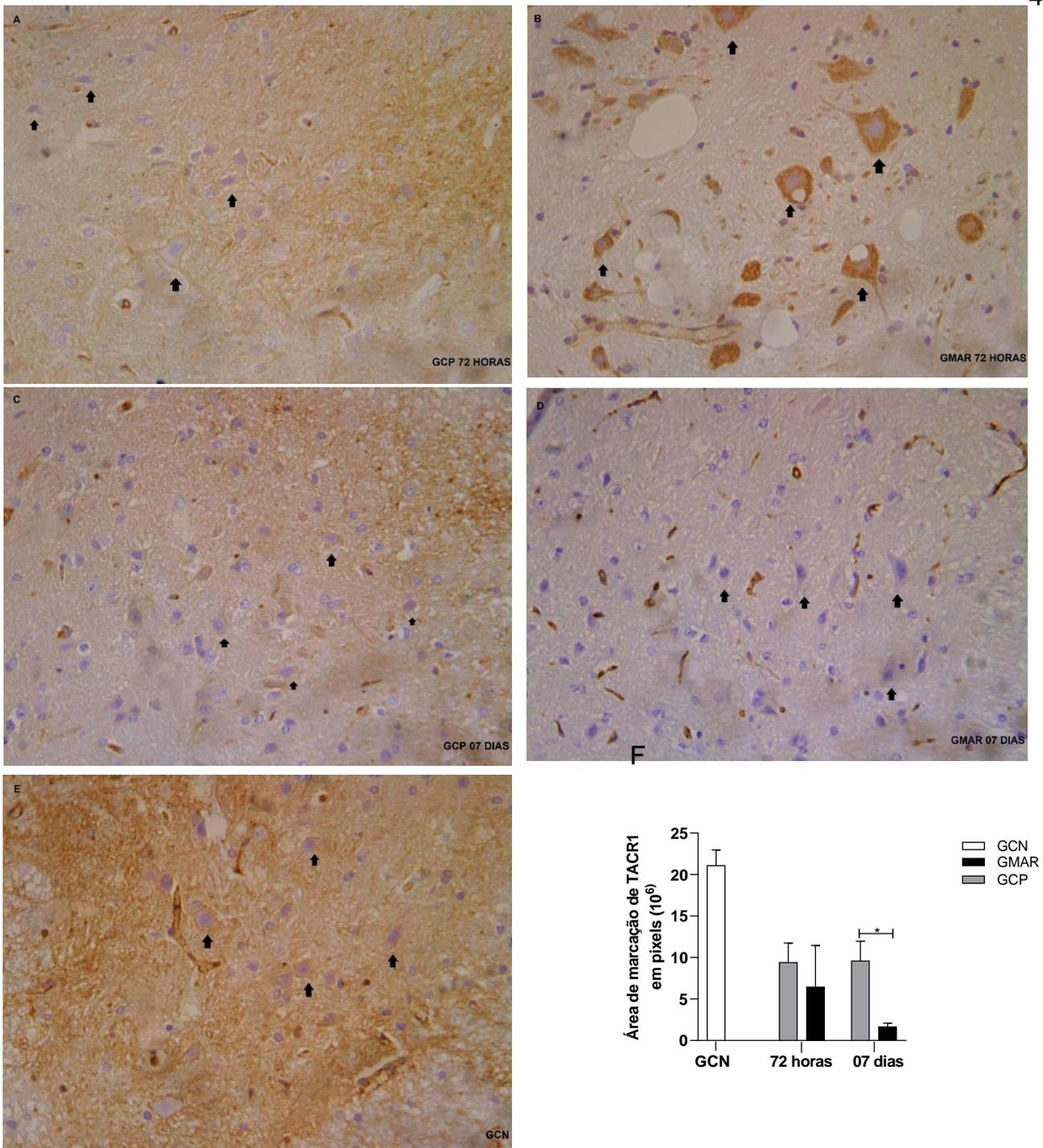


Figura 11: Área de expressão do TACR1 na medula espinal de camundongos. (A-E) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de TACR1 em (A) Grupo controle positivo 72 horas; (B) Grupo maropitant 30 mg 72 horas; (C) Grupo controle positivo 07 dias; (D) Grupo Maropitant 07 dias; (E) Grupo controle negativo. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). F) Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de TACR1 (Média \pm SEM; n=6; * P<0,05, Aumento de 40x).

5.7 Correlação entre o TACR1, TNF α e GPx

Ao correlacionar o TACR1 com a citocina inflamatória TNF α e com a enzima antioxidante GPx 1/2, foi observado que existe uma correlação positiva moderada com $r = 0,6966$ (Figura 11A) e uma correlação negativa forte $r = -0,8551$ (Figura 11B), onde observa-se que a modulação na expressão dos receptores de taquicinininas promove supressão das vias inflamatórias e oxidantes na neuropatia diabética.

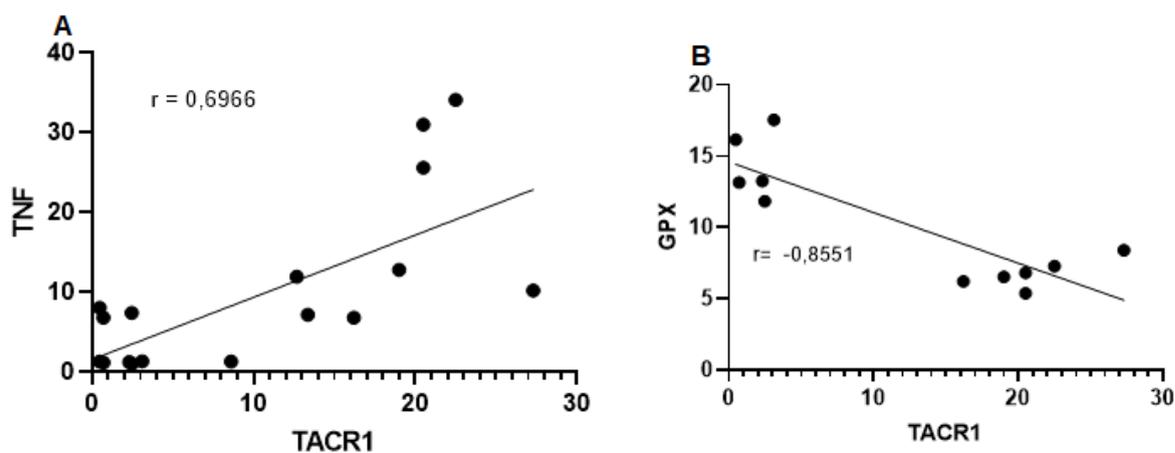


Figura 12: Correlação entre o receptor de neuroquinina-1 e a citocina TNF (A) GPx (B); $P = 0,0013$ em correlação TACR1 – TNF e $P = 0,0008$ na correlação TACR1 – GPx.

6 DISCUSSÃO

. No presente estudo, a dose de 30mg/kg foi eficaz em elevar o limiar nociceptivo mecânico após trinta minutos e com um pico de duas horas após a administração do fármaco. A dose de maropitant utilizada neste trabalho baseia-se na curva dose-resposta no estudo desenvolvido por Niella, (2020), onde a mesma avaliou seis doses de maropitant em modelo de neuropatia por lesão constritiva em ratos e observou que a dose de 30mg/kg/IP obteve uma ação anticonceptiva eficaz e duradora e teve um efeito de até 10 horas de ação analgésica. Outros estudos utilizando o mesmo fármaco demonstraram período hábil para efeito antiemético com duração semelhante, Kenward et al. (2017) relataram um efeito em cães através da via intravenosa, por até 8 horas, e por via subcutânea, até 23 horas (Puente-Redondo et al.2007). Já em coelhos, o tempo de ação de 10,4 horas \pm 1,6 horas e 13,1 \pm 2,44 horas pela via intravenosa e subcutânea respectivamente (Ozawa et al, 2019).

A substancia P é um neuropeptídeo liberada pelos nociceptores aferentes primários promovendo uma hiperexcitabilidade neuronal e exacerbando em condições patológicas a hiperalgesia e alodinia (LIU e BAUSMAN, 1997). No presente estudo, as neuropatias diabéticas induziram lesão neuronal devido as alterações metabólicas, ao passo que o maropitant modulou essas alterações durante a neuropatia diabética promovendo assim uma ação analgésica. Esse achado condiz com o estudo da Coudoré-Civiale et al. (2000), que obtiveram resultados semelhantes com o uso de antagonistas do receptor NK1.

Os resultados demonstraram que houve uma maior ativação da microglia marcada pela molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1 (IBA-1) nos animais diabéticos (GCP72 e GCP7). Sabe-se que o número de células da micróglia na medula espinal é capaz de ser ativada na primeira semana após a indução da estreptozotocina (TON et al., 2013). É possível que além as alterações promovidas pelas vias metabólicas advindas das ativações das vias polioli, hexosamina, AGEs e proteínas kinases C possam contribuir para um estado de neuroinflamação e de estresse oxidativo, há também a participação da microglia na manutenção e progressão da dor neuropática (SANDIREDDY et al., 2014; SCHOLZ et al., 2008).

A dose de 30 mg/kg do maropitant foi efetiva em reduzir a ativação da microglia, como também na redução da citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como na elevação da interleucina antiinflamatória IL10, no presente trabalho, o que pode sugerir um efeito antiinflamatório. YARAE et al. (2003) e DELGADO et al. (2003) verificaram que a substância P é capaz de ativar macrófagos, linfócitos e granulócitos de camundongos e ratos, e induzir um aumento na liberação de citocinas pró inflamatórias por essas células, tais como o TNF α e das interleucinas IL1 α , IL1 β e IL10, que por sua vez aumentam a excitabilidade neuronal, enquanto reforçam a ativação glial, atuando em um feedback positivo na propagação e manutenção da neuropatia diabética (MAGRINELLI et al., 2015), o que poderia contribuir para o desenvolvimento da neuroinflamação. Esse aumento na liberação de citocinas parece ser decorrente da ativação rápida e aumentada do fator de transcrição NF- κ B pela substância P, como observado por MARRIOT et al. (2000) em macrófagos. Corroborando com essa ideia, houve também o aumento do TNF- α na medula dos animais diabéticos (GCP 07 dias). O TNF- α é uma das principais citocinas envolvidas no processo inflamatório, possuindo como principal efeito a promoção da resposta imune e inflamatória por meio das alterações na microcirculação aumentando o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da inflamação, além de ativar outras citocinas, devido a intensa lesão no nervo, promovido pela hiperglicemia, o aumento exacerbado de TNF- α desencadeia liberação, em excesso, de toda a cascata inflamatória, o que acarreta um ciclo extremamente citotóxico lesionando o nervo (POP-BUSUI et al., 2016).

Concomitantemente ao aumento do NF- κ B pela substância P, acredita-se que simultaneamente ocorra a redução da atividade do fator nuclear relacionado ao eritroide - 2 (Nrf-2), sendo então caracterizada por um declínio nos níveis de SOD, catalase e glutathiona reduzida (GSH) devido estado hiperglicêmico (KANSANEN et al., 2013; SANDIREDDY et al., 2014). No presente estudo foi demonstrado a redução da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx 1/2) nos animais com neuropatia diabética. Corroborando com o estudo Luo et al., (2020), onde descreveram uma melhora do estresse oxidativo em ratos com cardiomiopatia diabética ao restaurar a atividade do Nrf-2. O maropitant foi efetivo em elevar os níveis de GPx 1/2 nos animais diabéticos (GMAR 07dias),

comparados aos animais diabéticos que não receberam tratamento (GCP 07 dias). Indicando assim um possível efeito antioxidante, através da redução da substância P o que pode culminar na elevação do Nrf2. Essa hipótese é corroborada através de um estudo que identificou que ambos os fatores NF – kB e Nrf2, possuem uma via de ligação dupla na geração da inflamação e do estresse oxidativo (WARDYN; PONSFORD; SANDERSON, 2015).

No presente estudo observou-se uma redução na expressão do HIF-1 α nos animais com neuropatia diabética, isso ocorre devido a hiperglicemia ocasionar uma desestabilização das proteínas do HIF, reduzindo assim a sua expressão, conseqüentemente essa redução favorece um aumento na geração do estresse oxidativo, ocasionado pela não translocação mitocondrial e nuclear (GUNTON, 2020; BRISTON; YANG; ASHCROFT, 2011). Esse achado é condizente com um estudo descrito por Li, (2019), onde atribuiu o efeito antioxidante do HIF a partir de sua translocação mitocondrial, agindo assim na organela, evitando a geração excessiva do ROS, além desse estudo, um descrito por Rojas et al., (2018) associam o HIF1 α a um modulador a geração excessiva de ROS em neurônios sensoriais periféricos exercendo assim uma função protetora a danos nervosos induzidos por hiperglicemia, limitando os níveis de ROS e induzindo a expressão do fator de crescimento endotélio vascular (VEGF). No presente trabalho houve aumento na expressão do HIF1 α com a administração do maropitant, isso pode estar relacionado com ativação da via de proteínas kinases ativadas por mitogênio (MAPK) principalmente das vias p38, quinase relacionada ao sinal extracelular (ERK) e quinase N-terminal c-Jun (JNK), que estão relacionadas na geração de neuropatia e apoptose neuronal, através do estado hiperglicêmico e da ativação via substância P. (GUNTON, 2020; KIKKAWA; KOYA; HANEDA, 2003). Já existem alguns estudos que sugerem que há uma atuação da substância P na ativação da via MAPK (FIEBICH et al., 2000; SUN et al., 2008), com isso é possível sugerir que o uso do maropitant reduza a ação da substância P, conseqüentemente a ativação do MAPK.

Como demonstrado nesse estudo, o maropitant exerceu antagonismo do receptor de neuroquinina-1 na neuropatia diabética. É conhecido que os receptores NK1 estão presentes nas vias de dor no sistema nervoso periférico e central e quando associados a substância P, são responsáveis por importantes funções

homeostáticas como inflamação, emese e estímulos dolorosos (BOSCAN et al., 2011; NIYOM et al., 2013; BARBARESI et al., 2014; MASHAGHI et al., 2016).

Um estudo descrito por TSUKAMOTO et al. (2018) confirmaram que há expressão dos receptores NK1 e SP no pâncreas e com base nos achados do seu estudo, e a ação antiinflamatória do maropitant foi mediada pelo bloqueio do receptor NK1 presente no órgão. Esse estudo corrobora com um descrito por GRADDY et al. (2000), que descreveram que a ativação do NK1 pode promover efeitos antiinflamatórios no modelo de pancreatite aguda. No presente estudo demonstramos que é possível que ocorra uma correlação positiva entre o receptor NK1 e a liberação de TNF, onde uma ativação exacerbada do receptor esteja envolvido em uma maior liberação dessa citocina. Esses achados coadunam com um estudo descrito por COSTA et al. (2005), onde encontraram um aumento na liberação de leucócitos mediados por TNF na presença do receptor.

Ao correlacionar o receptor NK1 com a enzima antioxidante GPx 1/2, observou-se nesse estudo que a medida em que o antagonista age sobre o receptor, tende a ser observado um aumento na expressão da GPx em animais diabéticos, indicando assim um possível efeito antioxidante mediado pelo bloqueio do receptor. Esse efeito pode estar relacionado a normalização do Nrf-2, na qual sua desregulação está relacionado a redução das enzimas antioxidantes e a disfunção mitocondrial. Esse achado é condizente com os estudos descritos por WANG et al, (2019), e com descrito por Li et al., (2019), onde ambos os estudos atribuíram um efeito antioxidante ao antagonismo do receptor NK1.

7 CONCLUSÃO

O maropitant na dose de 30 mg/kg/24q promoveu aumento do limiar nociceptivo mecânico de forma eficaz após trinta minutos, com um pico após duas horas nos camundongos com neuropatia diabética. Houve atenuação da alodinia nos animais, com diminuição da ativação microglial, juntamente com a redução dos marcadores inflamatórios. Houve melhora do estresse oxidativo nos animais tratados com o maropitant, sendo ele capaz de aumentar a produção de glutathione peroxidase e fator indutor de hipóxia 1 alfa. Embora preliminares, nossos dados apontam o potencial uso terapêutico do maropitant como agente coadjuvante para o tratamento de pacientes com neuropática diabética.

REFERENCIAS

- AGUADO, D.; ABREU, M.; BENITO, J.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ DE SEGURA, I.A. Amitriptyline, minocycline and maropitant reduce the sevoflurane minimum alveolar concentration and potentiate remifentanyl but do not prevent acute opioid tolerance and hyperalgesia in the rat - A randomised laboratory study. **European Journal of Anaesthesiology**, v.4, n.32, p. 248 – 254, 2015.
- ANDERSSON, D. A.; FILIPOVIĆ, M. R.; GENTRY, C.; EBERHARDT, M.; VASTANI, N.; LEFFLER, A.; REEH, P.; BEVAN, S. Streptozotocin stimulates the ion channel TRPA1 directly involvement of peroxynitrite. **The journal of biological chemistry**, v. 290, n. 24, p. 12185-15196, 2015.
- AVILLAR, B.M. et al. Effect of epidural end intravenous use of the neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonist maropitant on the sevoflurane minimum alveolar concentration (MAC) in dogs. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.39, p. 201-205, 2012
- BARBARESI P, FABRI M, & MENSÀ E. Characterization of NO-producing neurons in the rat corpus callosum. *Brain and Behavior*. v. 4, p. 317 – 336, 2014.
- BOSCAN, P.; MONNET, E.; MAMA, K.; TWEDT, D.C.; CONGDON, J.; STEFFEY, E.P. Effect of maropitant, a neurokinin 1 receptor antagonist, on anesthetic requirements during noxious visceral stimulation of the ovary in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, p. 1576–1579, 2011
- BOSCAN, Pedro et al. Effect of maropitant, a neurokinin 1 receptor antagonist, on anesthetic requirements during noxious visceral stimulation of the ovary in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 72, n. 12, p. 1576-1579, 2011.
- BRISTON, Thomas; YANG, Jun; ASHCROFT, Margaret. HIF-1 α localization with mitochondria: a new role for an old favorite?. **Cell Cycle**, v. 10, n. 23, p. 4170-4171, 2011.
- BRISTON, Thomas; YANG, Jun; ASHCROFT, Margaret. HIF-1 α localization with mitochondria: a new role for an old favorite?. **Cell Cycle**, v. 10, n. 23, p. 4170-4171, 2011.
- CALCUTT, Nigel A. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. **International review of neurobiology**, v. 50, p. 205-228, 2002.
- CALLAGHAN, Brian C.; HUR, Junguk; FELDMAN, Eva L. Diabetic neuropathy: one disease or two?. **Current opinion in neurology**, v. 25, n. 5, p. 536, 2012.
- CORRÊA, Janaina MX et al. Evaluation of the antinociceptive effect of maropitant, a neurokinin-1 receptor antagonist, in cats undergoing ovariohysterectomy. **Veterinary medicine international**, v. 2019, 2019.
- CORRIGAN, F.; VINK, R.; TURNER, R.S. Inflammation in acute CNS injury: a focus on the role of substance P. **Bristh journal of farmacology**, 2015

COSTA, Soraia KP et al. Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF α in the cutaneous microvasculature. **Journal of neuroimmunology**, v. 171, n. 1-2, p. 99-109, 2006.

COUDORÉ-CIVIALE, Marie-Ange et al. Evidence for an involvement of tachykinins in allodynia in streptozocin-induced diabetic rats. **European journal of pharmacology**, v. 401, n. 1, p. 47-53, 2000.

CUNHA, T.M.; VERRI JR., W.A.; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F. et al. Um teste eletrônico da pata de nocicepção do medidor de pressão para ratos. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**. v.37, n. 3, p.401-407, 2004

DE LA PUENTE-REDONDO, V. A. et al. The anti-emetic efficacy of maropitant (Cerenia™) in the treatment of ongoing emesis caused by a wide range of underlying clinical aetiologies in canine patients in Europe. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p. 93-98, 2007.

DE LA PUENTE-REDONDO, V. A. et al. The anti-emetic efficacy of maropitant (Cerenia™) in the treatment of ongoing emesis caused by a wide range of underlying clinical aetiologies in canine patients in Europe. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p. 93-98, 2007.

DELFINO, V. D. A.; FIGUEIREDO J. F.; MATSUO T.; FAVERO M.E.; MATNI A. M.; MOCELIN A. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-6, 2002.

DELGADO, A. V.; McMANUS, A. T.; CHAMBERS, J. P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. **Neuropeptides**, v.37, p.355-361, 2003

DEWANJEE, Saikat et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. **European journal of pharmacology**, v. 833, p. 472-523, 2018.

ENDEMANN, Dierk H.; SCHIFFRIN, Ernesto L. Nitric oxide, oxidative excess and vascular complications of diabetes mellitus. **Current hypertension reports**, v. 6, n. 2, p. 85-89, 2004.

FELDMAN, Eva L. et al. Diabetic neuropathy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1-18, 2019.

FELDMAN, Eva L. et al. New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain. **Neuron**, v. 93, n. 6, p. 1296-1313, 2017.

FERNYHOUGH, Paul. Mitochondrial dysfunction in diabetic neuropathy: a series of unfortunate metabolic events. **Current diabetes reports**, v. 15, n. 11, p. 1-10, 2015.

FIEBICH, Bernd L. et al. The neuropeptide substance P activates p38 mitogen-activated protein kinase resulting in IL-6 expression independently from NF- κ B. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 10, p. 5606-5611, 2000.

FURMAN, B. L. Modelos diabéticos induzidos por estreptozotocina em camundongos e ratos. *Protocolos atuais em farmacologia*, v. 70, n. 1, p. 5,47. 1-5,47. 20 de 2015.

GAGLIARDI, Antonio RT. Neuropatia diabética periférica. **Jornal vascular brasileiro**, v. 2, n. 1, p. 67-74, 2020.

GRADY, E. F.; YOSHIMI, S. K.; MAA, J.; VALEROSO, D.; VARTANIAN R. K. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. **British Journal of Pharmacology**. v.130, p.505–512, 2000.

GRADY, Eileen F. et al. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. **British journal of pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 505-512, 2000.

GRAHAM, Melanie L. et al. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. **Comparative medicine**, v. 61, n. 4, p. 356-360, 2011.

GRAHAM, Melanie L. et al. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. **Comparative medicine**, v. 61, n. 4, p. 356-360, 2011.

GUEDES, R.P. Efeito da secção do nervo ciático, como modelo de dor neuropática, sobre marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes na medula espinhal de ratos. Tese de doutorado apresentada ao Programa de pósgraduação em ciências biológicas: fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GUNTON, Jenny E. et al. Hypoxia-inducible factors and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 10, 2020.,

International Diabetes Federation. IDF Diabetes atlas 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Available at: <https://www.diabetesatlas.org/> Acessado dia 16/12/2020

ISLAM, M. et al. Streptozotocin is more convenient than Alloxan for the induction of Type 2 diabetes. **International Journal of Pharmacological Research**, v. 7, n. 1, p. 06-11, 2017.

JAVED, Saad et al. Treatment of painful diabetic neuropathy. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 6, n. 1, p. 15-28, 2015.

JESUS, Carlos Henrique Alves et al. Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors. **Brain research**, v. 1715, p. 156-164, 2019.

KANSANEN, Emilia et al. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 45-49, 2013.

KARNA, Sandeep Raj et al. Evaluation of analgesic interaction between morphine, dexmedetomidine and maropitant using hot-plate and tail-flick tests in rats. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 46, n. 4, p. 476-482, 2019.

KENWARD, Hannah et al. Anti-nausea effects and pharmacokinetics of ondansetron, maropitant and metoclopramide in a low-dose cisplatin model of nausea and vomiting in the dog: a blinded crossover study. **BMC veterinary research**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2017.

KIKKAWA, Ryuichi; KOYA, Daisuke; HANEDA, Masakazu. Progression of diabetic nephropathy. **American journal of kidney diseases**, v. 41, n. 3, p. S19-S21, 2003.

LAIRD JM, Olivar T, Roza C et al. (2000) Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. **Neuroscience** **98**, 345–352.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, Berlin, v. 51, p. 216–226, 2008.

LI, Hong-Sheng et al. HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. **Redox biology**, v. 25, p. 101109, 2019.

LI, Qianqian et al. Tachykinin NK1 receptor antagonist L-733,060 and substance P deletion exert neuroprotection through inhibiting oxidative stress and cell death after traumatic brain injury in mice. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 107, p. 154-165, 2019.

LIN, C.C.; CHEN, W.N.; CHEN, C.J.; LIN et al. Papel antinociceptivo da substância P na dor muscular crônica induzida por ácido. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.109, n.2, p.76-83, 2012.

Liu, H., Mantyh, P. & Basbaum, A. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature** **386**, 721–724 (1997).

LUO, Jierong et al. Allopurinol reduces oxidative stress and activates Nrf2/p62 to attenuate diabetic cardiomyopathy in rats. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 2, p. 1760-1773, 2020.

MAGRINELLI, Francesca et al. The association between serum cytokines and damage to large and small nerve fibers in diabetic peripheral neuropathy. **Journal of diabetes research**, v. 2015, 2015.

MARITIM, A. C.; SANDERS, aRA; WATKINS III, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MARRIOTT, I.; MASON, M. J.; ELHOFY, A.; BOST, K. L. Substance P activates NF κ B independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. **Journal of Neuroimmunology**, v.102, p.163-171, 2000.

MASHAGHI, A.; MARMALIDOU, A.; TEHRANI, M.; GRACE, P.M.; POTHOUKAKIS, C.; DANA, R. Neuropeptide substance P and the immune response. **Cellular and molecular life sciences** l. v. 73. n.22, p.4249 – 4264, 2016.

MILLAN, Mark J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MOGHADDASI, M. et al. An ex vivo preparation of mature mice spinal Cord to study synaptic transmission on motoneurons. **Journal of Neuroscience methods**, v.159, p.1-7, 2007.

NIELLA, R. V. Avaliação dos efeitos antinociceptivos do maropitant em modelo de neuropatia periférica induzida por lesão constritiva crônica em ratos /Dissertação (Mestrado em ciência animal) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA: UESC, 2020

NIYOM, Sirirat et al. Effect of maropitant, a neurokinin-1 receptor antagonist, on the minimum alveolar concentration of sevoflurane during stimulation of the ovarian ligament in cats. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 40, n. 4, p. 425-431, 2013.

OKANO S, Ikeura Y, Inatomi N (2002) Effects of tachykinin NK1 receptor antagonists on the viscerosensory response caused by colorectal distention in rabbits. **J Pharmacol Exp Ther** 300, 925–931

Ozawa SM, Hawkins MG, Drazenovich TL, Kass PH, Knych HK. Pharmacokinetics of maropitant citrate in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Am J Vet Res**. 2019 Oct;80(10):963

PICKUP, John C.; WILLIAMS, Gareth (Ed.). **Textbook of diabetes**. Blackwell Scientific Publications, 1991.

POP-BUSUI, Rodica et al. Inflammation as a therapeutic target for diabetic neuropathies. **Current diabetes reports**, v. 16, n. 3, p. 29, 2016.

RADENKOVIC, M., STOJANOVIĆ M., JANKOVIĆ R., TOPALOVIĆ M., STOJILJKOVIĆ M. Effects of diabetes and vascular occlusion on adenosine-induced relaxant response of rat common carotid artery. **Pharmacol Rep**. 65(3):632-41. 2013.

RAMASAMY, Ravichandran et al. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): a formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging. **Current molecular medicine**, v. 7, n. 8, p. 699-710, 2007.

RISTIKJ-STOMNAROSKA, Daniela; RISTESKA-NEJASHMIKJ, Valentina; PAPAZOVA, Marija. Role of inflammation in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. **Open access Macedonian journal of medical sciences**, v. 7, n. 14, p. 2267, 2019.

ROJAS, Daniel Rangel et al. Hypoxia-inducible factor 1 α protects peripheral sensory neurons from diabetic peripheral neuropathy by suppressing accumulation of reactive oxygen species. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 12, p. 1395-1405, 2018.

ROMÁN-PINTOS, Luis Miguel et al. Diabetic polyneuropathy in type 2 diabetes mellitus: inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function. **Journal of diabetes research**, v. 2016, 2016.

RUGGIERI MR, Filer-Maerten S, Hieble JP et al. (2000) Role of neurokinin receptors in the behavioral effect of intravesical antigen infusion in guinea pig bladder. *J Urol* 164, 197–202

SANDIREDDY, Reddemma et al. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.

SATO, Karina L. et al. Diabetes como modelo de neuropatia autonômica. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 39, n. 1, p. 28-38, 2006.

SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1361-1368, 2007.

SCHRAM, Miranda T. et al. Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. **Diabetes care**, v. 26, n. 7, p. 2165-2173, 2003.

SCHREIBER, Anne K. et al. Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 3, p. 432, 2015.

SEDLACEK, H. S. et al. Comparative efficacy of maropitant and selected drugs in preventing emesis induced by centrally or peripherally acting emetogens in dogs. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 31, n. 6, p. 533-537, 2008.

SILVA, J.F. Efeitos dos hormônios tireoidianos na cinética de migração das células trofoblásticas e no perfil endócrino, angiogênico e imune da placenta de ratas e na expressão gênica das células trofoblásticas de camundongo. 2014. 162f. Tese (Doutorado em Patologia Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014

SLOAN, Gordon et al. A new look at painful diabetic neuropathy. **Diabetes research and clinical practice**, v. 144, p. 177-191, 2018.

SOARES, Priscila CLR et al. Continuous Infusion of Ketamine and Lidocaine Either with or without Maropitant as an Adjuvant Agent for Analgesia in Female Dogs Undergoing Mastectomy. **Veterinary Medicine International**, v. 2021, 2021.

STAVNIICHUK, Roman et al. Peroxynitrite and protein nitration in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 30, n. 8, p. 669-678, 2014.

SUN, Jia et al. Substance P enhances NF-κB transactivation and chemokine response in murine macrophages via ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 294, n. 6, p. C1586-C1596, 2008.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, p. 537–546. 2001

TON, Bich-Hoai Thi et al. Activation profile of dorsal root ganglia Iba-1 (+) macrophages varies with the type of lesion in rats. **Acta histochemica**, v. 115, n. 8, p. 840-850, 2013.

TSUKAMOTO, Atsushi et al. The anti-inflammatory action of maropitant in a mouse model of acute pancreatitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 17-0483, 2018.

Vincent, A. M., Russell, J. W., Low, P. & Feldman, E. L. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocr. Rev.** 25, 612–628 (2004).

VINCENT, Andrea M. et al. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 10, p. 573, 2011.

WANG, Zhijia et al. Protective effects of a neurokinin 1 receptor antagonist on airway epithelial mitochondria dysfunction in asthmatic mice via Nrf2/HO-1 activation. **International immunopharmacology**, v. 77, 2019.

WARDYN, Joanna D.; PONSFORD, Amy H.; SANDERSON, Christopher M. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. **Biochemical society transactions**, v. 43, n. 4, p. 621-626, 2015.

YANG, Xin-Wei et al. Antioxidation and anti-inflammatory activity of Tang Bi Kang in rats with diabetic peripheral neuropathy. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.

YARAEI, R.; EBTEKAR, M.; AHMADIANI, A.; SABAHI, F. Neuropeptides (SP and CGRP) augment pro-inflammatory cytokine production in HSV-infected macrophages. **International Immunopharmacology**, v.3, p.1883-1887, 2003.

ANEXO I - PROTOCOLO DA IMUNOISTOQUÍMICA

Kit: Estreptovidina-biotina-peroxidase

1º DIA

- XILOL 1 (30 minutos)
- XILOL 2 (30 minutos)
- ÁLCOOL ABS 1 (5 min)
- ÁLCOOL ABS 2 (5 min)
- ÁLCOOL ABS 3 (5 min)
- ÁLCOOL 90% (5 min)
- ÁLCOOL 80% (5 min)
- ÁLCOOL 70% (5 min)
- ÁGUA CORRENTE (5 min)

- BANHO MARIA A 98° C (tampão citrato pH 6,0) (20 min dentro e 20 min na temperatura ambiente)

Tampão Citrado:

1,05 g de ácido cítrico + 500 mL de H₂O (água destilada ☺)

- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)

PBS:

1 L de dH₂O + 7,2 g de NaCl + 0,43 g de fosfato de sódio onobásico + 1,48 g de fosfato de sódio dibásico

- BLOQUEIO PEROXIDASE (30 min) (no escuro – 6 mL de H₂O₂ e completar para 200 ml de metanol) - fazer na hora

- TBS (5 min)
- TBS (5 min)

- SORO BLOQUEIO (30 min) – câmara úmida a temperatura ambiente
- ANTICORPO 1º (overnight) – câmara úmida na geladeira

2º DIA

- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)

- ANTICORPO 2º (45 min) – câmara úmida a temperatura ambiente

- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)

- ESTREPTOVIDINA –PEROXIDASE (30 min) (câmara úmida a temperatura ambiente)

- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)

- **DAB** (= REVELADOR) (1 gota em 1 mL de diluente)

Observações: O tempo do DAB varia de acordo o anticorpo 1º. Para 24 lâminas, fez-se 500 microlitros de diluente para 25 microlitros de DAB (1:20).

- ÁGUA CORRENTE (10 min)
- HEMATOXILINA (12 segundos)

- ÁGUA CORRENTE (10 min)
- ÁLCOOL 70% (5 min)
- ÁLCOOL 80% (5 min)
- ÁLCOOL 90% (5 min)
- ÁLCOOL ABS 1 (30 min)
- ÁLCOOL ABS 2 (30 min)
- ÁLCOOL ABS 3 (30 min)
- ÁLCOOL ABS 4 (30 min)
- XILOL 1 (10 min)
- XILOL 2 (10 min)
- Montagem da lâmina

Tabela 2- Anticorpos utilizados com suas respectivas diluições e tempo de incubação com diaminobenzidina (DAB).

Anticorpo	Espécie/clone	Diluição	DAB
anti-IBA-1	Camundongo/ monoclonal	1:3000	1 minuto
anti-TNF α	Camundongo/ monoclonal	1:500	3 minutos
anti – IL10	Camundongo/monoclonal	1:8000	1 minuto
Anti-HIF 1A	Camundongo/monoclonal	1:3000	45 segundos
anti-GPX 1/2	Rato/monoclonal	1:4000	1 minuto
Anti-TACR1	Camundongo/monoclonal	1:600	1 minuto