



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-UFC
CAMPUS SOBRAL – CEARA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ESTUDO DAS CORRENTES DE Na⁺ DEPENDENTES DE VOLTAGEM
EXPERIMENTAIS E SIMULADAS DO GÂGLIO CERVICAL SUPERIOR DE
RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA.**

FLÁVIO MARQUES DAMASCENO

**SOBRAL
2023**

FLÁVIO MARQUES DAMASCENO

**ESTUDO DAS CORRENTES DE Na⁺ DEPENDENTES DE VOLTAGEM
EXPERIMENTAIS E SIMULADAS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR
DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA.**

Disertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Linha de Pesquisa: Neurociências

Orientador Prof.^o Dr. Francisco Walber
Ferreira da Silva

**SOBRAL
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D162e Damasceno, Flavio Marques.

ESTUDO DAS CORRENTES DE Na⁺ DEPENDENTES DE VOLTAGEM
EXPERIMENTAIS E SIMULADAS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR DE RATOS
DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA. / Flavio Marques Damasceno. –
2023.

69 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva.

1. Diabetes melitos. 2. Canais de sódio dependentes de voltagem. 3. Gânglio cervical
superior. 4. Simulação computacional. 5. Registro eletrofisiológico. I. Título.

CDD 610

**ESTUDO DAS CORRENTES DE Na⁺ DEPENDENTES DE VOLTAGEM
EXPERIMENTAIS E SIMULADAS DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR DE
RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA.**

Disertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Aprovado em: __/__/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva.
Universidade Federal do Ceará - UFC (Orientador)

Prof.^a Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará – UFC (Examinadora)

Prof. Dr. Klausen Oliveira Abreu
Universidade Estadual do Ceara – UECE (Examinador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua eterna bondade e incondicional amor para comigo.

Aos meus saudosos pais pela educação e formação de caráter que recebi.

À minha família pelo apoio e dedicação constante.

Ao meu Orientador Dr. Walber pela paciência, dedicação e toda a experiência compartilhada.

A todos os amigos que estiveram presentes durante essa jornada, em especial a Maria Siqueira (*in memoriam*) que por muitas vezes perguntou sobre o andamento dos experimentos e como estava a “saúde dos animais”.

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo”.

Albert Einstein

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico com grande prevalência mundial na população adulta e idosa, sendo frequentemente associado a uma série de complicações orgânicas, entre elas alterações na expressão e/ou função de canais de sódio dependente de voltagem (Na_v). O modelo de DM induzido por estreptozotocina (STZ) tem sido amplamente utilizado para o estudo dessas complicações. O objetivo deste estudo foi obter as correntes de Na_v de neurônios do Ganglio Cervical Superior (GCS) de animais sadios e com DM induzida por STZ e posteriormente comparar estes com dados simulados em programa computacional. Sobre os aspectos metodológicos, os dados desse trabalho são provenientes do projeto submetido ao CEUA/UECE, que recebeu aprovação sob número 080921131/2020. Foram utilizados *Rattus norvegicus* da variedade Wistar de ambos os sexos, a obtenção dos registros eletrofisiológicos dos Na_v foram obtidos através da técnica de patch clamp. Já as simulações têm como base um modelo simplificado de célula através do software Dev-C++ versão 6.30. Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média, sendo a comparação entre os grupos foi realizado pelo teste-t de Student. Após a indução do DM, foi possível verificar que houve redução da massa corpórea nesse grupo de animais e manutenção do quadro de hiperglicemia. Sobre os achados eletrofisiológicos, ocorreu alteração na amplitude de corrente sendo menor para o grupo DM, o que foi comprovado também na avaliação dos traçados representativos. Na simulação correntes de Na^+ , utilizamos de um programa de linguagem C/C++ conforme as equações de Belluzzi e Sacchi (1991 e 1998). Após realizar os ajustes necessários em algumas das medidas utilizadas nas equações, foi possível reproduzir de maneira simulada as curvas e traçados encontradas nos grupos experimentais. Conclui-se através desse estudo que o modelo de DM utilizado mostrou-se eficaz. Além disso, é capaz de realizar modificações nos parâmetros eletrofisiológicos dos Na_v . Por fim as simulações desenvolvidas forneceram uma boa previsão para os achados de correntes de Na^+ .

Palavras-chave: Diabetes melitos; Canais de sódio dependentes de voltagem; Gânglio cervical superior; Simulação computacional; Registro eletrofisiológico.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder with high worldwide prevalence in the adult and elderly population, and is often associated with a series of organic complications, including changes in the expression and/or function of voltage-dependent sodium channels (Na_v). The streptozotocin-induced DM model (STZ) has been widely used to study these complications. The objective of this study was to obtain the Na_v currents of neurons of the Superior Cervical Ganglion (GCS) of healthy animals and with STZ-induced DM and later compare these with data simulated in a computer program. Regarding methodological aspects, the data of this work come from the project submitted to CEUA/UECE, which received approval under number 080921131/2020. *Rattus norvegicus* of the Wistar variety of both sexes were used, the electrophysiological recordings of the Na_v were obtained through the patch clamp technique. The simulations are based on a simplified cell model using the Dev-C++ software version 6.30. The data obtained were expressed as mean \pm standard error of the mean, and the comparison between groups was performed by Student's t-test. After DM induction, it was possible to verify that there was a reduction in body mass in this group of animals and maintenance of the hyperglycemia condition. Regarding the electrophysiological findings, there was a change in current amplitude, which was smaller for the DM group, which was also confirmed in the evaluation of representative tracings. In the simulation of Na^+ currents, we used a C/C++ language program according to Belluzzi and Sacchi equations (1991 and 1998). After making the necessary adjustments to some of the measurements used in the equations, it was possible to simulate the curves and traces found in the experimental groups. It is concluded from this study that the DM model used was effective. Furthermore, it is capable of modifying the electrophysiological parameters of Na_v . Finally, the developed simulations provided a good prediction for the Na^+ current findings.

Key words: Diabetes mellitus; Voltage gated sodium channels; Superior cervical ganglion; Computer simulation; electrophysiological recording

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Organização do canal de sódio -----	21
Figura 2- Localização do gânglio cervical superior -----	22
Figura 3: Modelo de Patch Clamp -----	32
Figura 4: Relação entre a Massa corpórea e Glicemia dos animais controle e diabéticos -----	36
Figura 5: Traçados representativos da ativação das correntes de Na+-----	38
Figura 6: Relação I-V da ativação da corrente de Na+ e condutância máxima -----	39
Figura 7: Traçados representativos da inativação das correntes de Na+ -----	41
Figura 8: Relação I-V da inativação da corrente de Na+ e razão $I/I_{máx}$ -----	41
Figura 9: Traçados simulados da corrente de Na+ do GCS -----	43
Figura 10: Comparação dos dados simulados com os experimentais -----	45
Figura 11: Relação I-V da ativação da corrente de Na+. -----	47
Figura 12: Comparação dos dados simulados com os experimentais -----	49
Figura 13: Relação I-V da inativação da corrente de Na+ -----	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados da massa corpórea e glicemia dos grupos controle e diabético-	37
Tabela 2: Dados da ativação da corrente de Na ⁺ no GCS -----	40
Tabela 3: Dados da inativação da corrente de Na ⁺ no GCS -----	42
Tabela 4: Dados da literatura para a simulação das correntes de Na ⁺ do GCS ---	42
Tabela 5: Alteração dos parâmetros de ativação da simulação para comparação com os dados experimentais do grupo controle -----	45
Tabela 6: Alteração dos parâmetros de inativação da simulação -----	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C°	Temperatura em Grau Celsius
Ca	Cálcio
CM	Capacitor de membrana
CT	Controle
DM	Diabetes mellitus
G	Condutância
GCS	Gânglio Cervical Superior
GC	Gânglio Celíaco
GMS	Gânglio Mesentérico Superior
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
H-H	Hodgkin-Huxley
I	Corrente
ISCB	Instituto Superior de Ciências Biomédicas
IV	Relação corrente-voltagem
kDa	Kilodalton
LEF	Laboratório de Eletrofisiologia
mV	Milivolts
Ms	Milisegundo
μS	Micro Siemes
nA	Nano Amperes
nS	Nano Siemes
Na _{v+}	Canais de Sódio Dependentes de Voltagem
Na ⁺	Canais de Sódio
PA	Potencial de Ação
PEPS	Potenciais Excitatórios Pós-sinápticos
PA	Pico Amperes
Rin	Resistência de entrada
RMP	potencial de membrana em repouso
SNA	Sistema Nervoso Autônomo

STZ	Estreptozotocina
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
TTX-S	Tetrodotoxina
V	Voltagem
VM	Potencial de membrana
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Diabetes melitus	16
2.2	Neuropatia diabética	17
2.3	Canais iônicos e canal de sódio dependentes de voltagem (Na_v)	19
2.4	Gânglio Cervical Superior e Canais de Na_v	22
2.5	Gânglio cervical superior, Canal de Na^+ e diabetes	24
2.6	Simulação computacional dos canais Na_v	26
3	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	28
4	OBJETIVOS	29
4.1	Objetivo Geral	29
4.2	Objetivos Específicos	29
5	MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1	Animais experimentais e a indução do diabetes	30
5.2	Registro eletrofisiológico com a técnica de patch clamp	31
5.3	Modelos Neuronais e Simulação Computacional	32
5.4	Comparação dos dados simulados com os registros eletrofisiológicos experimentais	34
5.5	Análise estatística	35
6	RESULTADOS	36
7	DISCUSÃO	50
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
	REFERENCIAS	58
	ANEXO I - Certificado da Comissão de Ética na Utilização de Animais	
	- CEUA da Universidade Estadual do Ceara - UECE	66
	APÊNDICE A - Programa de linguagem em C utilizado na simulação	67

1. INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM), é um grupo de doenças metabólicas caracterizado pela hiperglicemia resultante de distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, em função de defeitos na secreção de insulina e/ou da ação da insulina em órgãos alvo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). O diabetes é um relevante e crescente problema de saúde para os países independente do grau de desenvolvimento. Em 2015, a Federação Internacional de Diabetes estimou que cerca de 8,8% da população mundial da faixa etária entre 20 e 79 anos viviam com diabetes. Persistindo essa estimativa, estima-se que o número de pessoas com diabetes no ano de 2045 será superior a 629 milhões (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Pacientes com diabetes tem a tendência de sofrerem maiores transtornos e/ou complicações macrovasculares e microvasculares que frequentemente se manifestam, como as neuropatias. Logo, a neuropatia periférica tem o diabetes como uma das principais causas (PEDROSA, 2014).

De forma geral, a neuropatia diabética afeta regiões mais distais do corpo, como dedos do pé, mas progride lentamente, envolvendo os pés e as pernas em sentido proximal. Dessa forma, é comum a perda de fibras nervosas, tanto autonômicas quanto somáticas, e assim o aparecimento de outras doenças, como a retinopatia diabética, nefropatia e, principalmente, a dor de origem neuropática (TESFAYE; BOULTON; DICKENSON, 2013).

Conforme Downs e Faulkner (2015) a etiologia da neuropatia diabética é bastante complexa e envolve uma variedade de fatores que são capazes de promover o estresse metabólico. A administração de agentes químicos, como a estreptozotocina (STZ) realizada em modelos animais, é uma das formas de induzir o DM pela destruição das células beta-pancreáticas, aumentando a glicemia sérica e, conseqüentemente, comprometer a função nervosa, dando início a neurodegeneração.

Em relação às estruturas atingidas pela neuropatia diabética, destaca-se aqui o Gânglio Cervical Superior (GCS). Esse gânglio é responsável por inervar as

estruturas da face e crânio, tais como: hipófise, glândula pineal, eminência mediana, corpo carotídeo, glândula tireoide e paratireoide (SAVASTANO *et al.*, 2010). Os neurônios desse gânglio sofrem modificações no ponto de vista dos parâmetros eletrofisiológico em tecidos com DM, pois, nesse contexto há uma alteração da atividade da bomba de Na^+/k^+ ATPase (SILVA-DOS-SANTOS *et al.*, 2020). Portanto, sabemos que a bomba de Na^+/k^+ ATPase possui um papel eletrogênico e participa dos processos de manutenção da diferença de concentração iônica entre o meio interno e externo à célula.

Silva-dos-Santos *et al* (2020) explica no seu estudo que a ocorrência de DM promove várias alterações sobre os parâmetros fisiológicos do GCS, sendo assim ocorrem também alterações eletrofisiológicas devido alterações na atividade de canais iônicos, e transportadores.

De acordo com Hille (2001), a interface dos estudos sobre os canais iônicos vai além dos aspectos relacionados com a neurociência, sendo fundamentais para a biologia celular de forma geral. Logo praticamente todos os tipos de células possuem canais iônicos em sua constituição.

No caso de estudos relacionados com a propagação de sinais e transporte de íons nas células excitáveis tem mobilizado uma diversidade de cientistas interessados em descrever a melhor compreensão desses fenômenos biológicos. Por esses motivos, no caso das ciências exatas destacamos a construção de modelos matemáticos com base nas ferramentas computacionais que sejam satisfatórios para explicar o comportamento da atividade elétrica do sistema nervoso ou mesmo de um único neurônio, sendo assim é necessário o conhecimento e a pesquisa de uma variedade de dados literários (HACKMANN, 2007; QUINAUD, 2016).

Conforme Gabbiani *et al* (2010), trabalhos como este são importantes, pois apresentam contribuições diretas tanto na área da neurociência como da computação, o somatório dessas duas passam a ser conhecido como neurociência computacional. Na realidade esse novo conhecimento vem confirmar a abordagem interdisciplinar que existe entre as ciências.

Para evitar distorções decorrentes da arbitrariedade da construção de modelos (matemáticos e/ou computacionais) optamos por realizar uma abordagem interativa e

comportamental dos canais de Na⁺. Inicialmente trataremos de aspectos mais simples passando em seguida para elementos mais elaborados de acordo com as etapas que seguirem. Sobre a abordagem do canal iônico este terá como base o modelo de funcionamento a simulação computacional das correntes Na_v, dos neurônios do GCS em animais com DM, tendo como base inicial os modelos em que os animais foram induzidos por STZ.

Ao considerar o cenário descrito anteriormente, surgiu então o interesse pelo tema e a necessidade de melhor compreender os processos que envolvem o DM e a ocorrência da neuropatia no DM, levando-se em consideração a participação dos Na_v. Por esta razão, nosso estudo se propõe a desenvolver uma forma alternativa de pesquisa por meio da simulação computacional visando estudar a correlação que existe entre os dados experimentais obtidos em laboratório com aqueles obtidos de forma simulada.

Neste sentido esperamos que o estudo torne-se relevante ao aprofundar ainda mais o conhecimento sobre o papel dos canais iônicos que estão envolvidos nos processos de alteração de sensibilidade no DM. Assim como apresentar vias alternativas para o estudo das mesmas utilizando-se da neurociência computacional para melhor compreensão desses fenômenos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes melitus

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define que de forma geral, o diabetes é caracterizado como uma doença crônica decorrente da produção deficiente de insulina ou da incapacidade do organismo de utilizá-la de forma eficiente. Como resultado, a concentração basal de glicose na corrente sanguínea se eleva, resultando em hiperglicemia (OMS, 2023).

Entre os tipos de diabetes, destacamos o Diabetes mellitus (DM), como uma doença do pâncreas endócrino. Esta pode ser causada por uma variável de fatores tais como: pancreatite, autoimunidade, trauma pancreático, pancreatectomia, neoplasia, fator genético além de ser adquirido através do mau estilo de vida do indivíduo. Apesar de ser uma patologia que inicialmente afeta o pâncreas, o descuido e o não acompanhamento dos níveis glicêmicos pode acarretar em consequências sistêmicas, afetando diversos órgãos e promovendo complicações severas (WEI *et al.*, 2020).

De acordo com Raiol, Camara e Raiol (2012) os aspectos históricos do DM dão conta de que é uma doença conhecida há pelo menos três mil anos, sendo esta detectada pelos egípcios. O sintoma mais comum registrado naquela época era a poliúria que se dava ao longo do dia. O tratamento já naquele período era baseado em consumir extratos de plantas.

Ainda segundo os autores anteriores, o termo “Diabetes” foi assim denominado pelo médico grego Arateus da Capadócia no século II, que segundo ele, o DM era o derretimento da carne e dos membros para a urina. Somente por volta dos séculos V e VI, médicos da Índia, mencionaram que a urina de pacientes com diabetes era adocicada, fato comprovado pela observação de formigas, que eram atraídas pela urina destes pacientes (RAIO; CAMARA; RAIOL, 2012).

Para o diagnóstico do DM, as alterações fisiopatológicas precedem em muitos anos o diagnóstico da doença. A condição na qual os valores glicêmicos estão acima dos valores de referência, mas ainda abaixo dos valores diagnósticos de DM,

denomina-se pré-diabetes. A resistência à insulina já está presente e, na ausência de medidas de combate aos fatores de risco modificáveis, ela evolui frequentemente para a doença clinicamente manifesta e associa-se a risco aumentado de doença cardiovascular e outras complicações ao organismo. Na maioria dos casos de pré-diabetes ou diabetes, a condição é assintomática e o diagnóstico deve ser realizado com base em exames laboratoriais (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019).

Tradicionalmente, o termo “diabetes” descreve uma variedade de condições clínicas que têm em comum a micção excessiva, sendo caracterizada pelo excesso de açúcar no sangue (hiperglicemia) e na urina (glicosúria) (NELSON; COX, 2014). Entretanto, as complicações do diabetes são categorizadas principalmente como distúrbios microvasculares e macrovasculares, que resultam em retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença coronariana, doença cerebrovascular e doença arterial periférica (GREGG, SATTAR, ALI, 2016).

Desta forma, o diabetes tem se tornado um complexo problema de saúde pública, muitas vezes apontada como uma epidemia mundial. Dentre a população de risco encontram-se os idosos, por em sua maioria, terem dieta inadequada, serem sedentários e com conseqüente obesidade. São os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência da doença em todo mundo (GONÇALVES, *et al.* 2016).

Entre os principais exames realizados para o diagnóstico do DM estão: a glicemia em jejum, hemoglobina glicada e TOTG. Os valores de normalidade para os respectivos exames, bem como os critérios diagnósticos para pré-diabetes e DM mais aceitos são estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). A confirmação do diagnóstico de DM requer repetição dos exames alterados para então dar início a conduta terapêutica correta.

2.2 Neuropatia diabética

O DM apresenta-se como uma das causas mais comuns da neuropatia no mundo. A ocorrência de neuropatia é considerada responsável pelo sofrimento de milhares de pessoas, além do elevado gasto em saúde que crescem a cada ano com

a necessidade de cuidados desses pacientes, uma prova disto é que a neuropatia diabética estar entre as principais causas de amputações e internações hospitalares relacionadas (MOREIRA-JUNIOR, 2010).

Estima-se que a ocorrência da neuropatias diabéticas acaba afetando mais de 50% dos indivíduos com DM. A ocorrência de novos casos pode ser caracterizada por diversas formas, seja por sinais de disfunção em nervos do sistema nervoso periférico e/ou autonômico, ou ainda com manifestações clínicas muito variadas, que vão desde sensibilidade diminuída até sensibilidade aumentada (POP-BUSUI *et al.*, 2017).

A neuropatia diabética periférica trata-se de um distúrbio sensorial que promove no organismo a interrupção das aferências e eferências das extremidades, com isso o indivíduo acaba sendo acometido por uma série de transtornos de ordem sensorial (SANTOS, 2008).

Progressivamente, além da perda sensorial, é possível que haja também o envolvimento de fibras motoras, o que pode causar redução de força muscular e atrofia, com possível geração de deformidades ortopédicas nos pés. No caso de acometimento motor, os sintomas referidos são fraqueza muscular e instabilidade que são capazes de promover dificuldades na marcha e quedas (GOMES, *et al.* 2007; SANTOS, 2008).

Para complementar a citação anterior, as alterações no componente motor do paciente diabético, contribui também para a ocorrência de atrofia e fraqueza dos pequenos músculos dorsais, desencadeando desequilíbrio nos tendões flexores e extensores e deformidades em membros corporais. Já com relação ao componente autonômico, este reduz e/ou suprime as secreções de glândulas exócrinas, deixando os pés secos e predispondo-os a rachaduras e fissuras, além de desencadear alterações arteriovenosas. No que diz respeito às mudanças neuropáticas em geral, elas afetam primeiramente membros distais como os pés e posteriormente, progredem de forma proximal em direção à perna (MARTINELLO, 2010).

Lima (2018) explica que a alta glicemia do DM causa um acréscimo da concentração de glicose, sorbitol e frutose no nervo periférico, gerando um edema osmótico no nervo, redução na síntese de acetilcolina, decomposição das células de

Schwann e da bainha de mielina. Todos os fatores citados anteriormente contribuem para mudanças e alterações na velocidade de condução dos impulsos nervosos.

Barbosa, Oliveira e Seara (2009), também destacam que o estado glicêmico do DM causa a formação de produtos de glicação avançada que por meio de ligações não enzimáticas que gera prejuízos no processo de sinalização celular, alterando a sua função. Logo, a redução da sensibilidade é decorrente de uma variável de fatores.

Desta forma, as alterações sobre a redução da sensibilidade ocorrem principalmente devido aos fatores descritos anteriormente. Já de acordo com Lima (2018), o mecanismo responsável pelo aumento nas sensações somestésicas, como a dor neuropática, entretanto, é pouco compreendido e por isso necessita de maiores investigações.

Liu e Wood (2011) apresentam em seu estudo que a ocorrência de alterações na expressão ou função de canais iônicos parecem ser os principais mecanismos responsáveis por produzir as variações de sensibilidade observadas nas desordens neuropáticas. Ressalta-se ainda que a etiologia da neuropatia diabética é muito complexa e possui uma série de fatores implicados no seu desenvolvimento.

Brasileiro (2018) apresenta que é cada vez mais necessário a melhor compreensão dos fatores que envolvem as principais manifestações da neuropatia no DM, visto que se trata de uma patologia de grande prevalência e importante impacto na saúde pública mundial. Sendo assim estudos sobre esta percepção podem melhorar e/ou aperfeiçoar tratamento ou outras abordagens terapêuticas capazes de proporcionar melhor qualidade de vida aos sujeitos.

2.3 Canais iônicos e canal de sódio dependentes de voltagem (Na_v)

Os canais iônicos são proteínas que atravessam toda a membrana celular, e possibilitam a sinalização neuronal. Estes dependem das rápidas variações de potencial de ação através da membrana celular (a estrutura que delimita todas as células vivas, que estabelece fronteira entre o meio intracelular, o citoplasma, e o extracelular, e que permite a troca de elementos entre esses dois meios), pela condução de íons, que ocorre devido no plasmalema das células neuronais e

musculares, podendo passar até 100 milhões de íons por segundo em um só canal, o que produz uma variação rápida desses potenciais (KANDEL; SCHWARTZ e JESSELL, 2000).

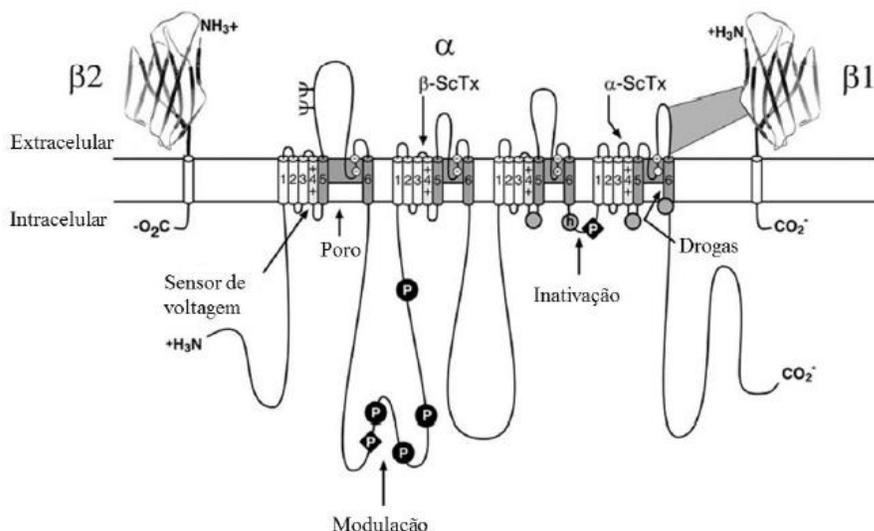
Cada canal iônico é formado por uma ou mais subunidades protéicas. Aquelas que formam o poro dentro da membrana são chamadas de subunidades principais. Os canais de sódio e cálcio têm apenas uma subunidade principal e os canais de potássio têm quatro (por isso são chamados de tetrâmeros). O modelo de Hodgkin-Huxley, - H-H, embora seja puramente fenomenológico, deu origem à ideia de representar canais iônicos em termos de portões que se abrem e se fecham (ROQUE, 2020).

Nos últimos anos, a compreensão dos canais iônicos avançou bastante através da determinação da estrutura 3D, cristalografia de raios-X e da utilização de métodos computacionais para simular os movimentos dinâmicos dos átomos em função do tempo. Em relação a estrutura arquitetônica, os canais de Na⁺ possuem uma região porosa estreita chamada filtro de seletividade, onde os íons permeados são completamente ou parcialmente desidratados para a sua passagem através da membrana (ROUX, 2017).

Os Na_v são alguns dos tipos de canais iônicos e estão envolvidos com a iniciação e propagação dos potenciais de ação em neurônios, células musculares e alguns tipos de células neuroendócrinas. Quando a membrana é despolarizada os Na_v se ativam e inativam em milissegundos permitindo um influxo rápido e transitório de íons sódio e iniciando o potencial de ação. Existem nove subtipos de canais Na_v, denominados Na_v1.1 a Na_v1.9, que foram encontrados distribuídos heterogeneamente em tecidos de mamíferos (CATERALL; GOLDIN; WAXMAN, 2005).

Na realidade os Na_v são constituídos por um complexo contendo uma subunidade α de 260 kDa, associado a uma ou mais subunidades β auxiliares (β 1, β 2 e/ou β 3) de 33-36 kDa. A subunidade α resulta de uma única sequência de aproximadamente 2000 resíduos de aminoácidos que se inserem 24 vezes na membrana celular. Estas inserções, ou seguimentos transmembrana, se dividem em quatro regiões homólogas, denominados domínios I-IV, com cada domínio contendo seis segmentos transmembrana (S1-S6) (figura 1) (MACEDO, 2017).

Figura 1: Organização do canal de sódio



Fonte: Adaptado de Catterall, Goldin, Waxman (2005)

A ativação dos Na_v desempenham um papel essencial na excitabilidade neuronal, incluindo o início e a propagação de potenciais de ação. Os resultados de muitos estudos realizados em modelos de animais experimentais e, numa menor proporção, estudos em seres humanos, mostraram que os neurônios sensoriais alteram sua expressão de Na_v após lesões inflamatórias e de lesão nervosa, sendo que essas alterações podem contribuir para a ativação das vias da dor e o desenvolvimento de estados de dor aguda e crônica (LUO *et al.*, 2010).

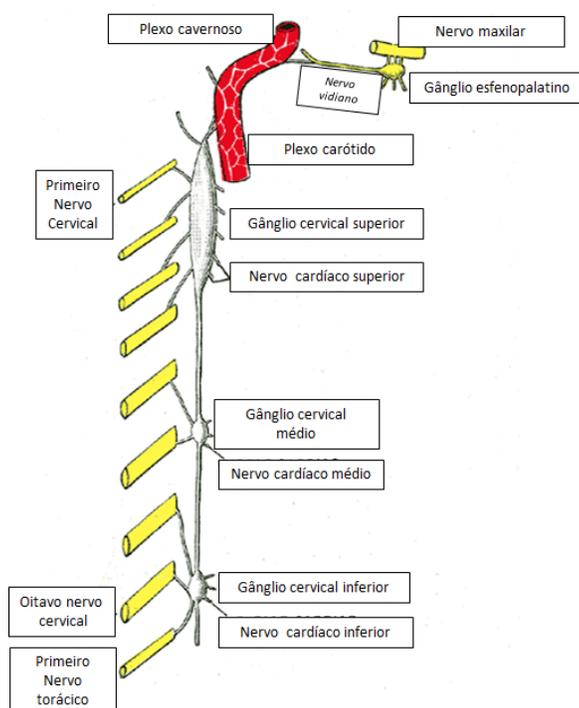
Como descrito por Macedo (2017) os Na^+ abrem em resposta a despolarização e, após um intervalo de tempo de 1-2 ms, se tornam impermeáveis. Este processo é crucial para disparos sequenciados de potencial de ação. Nos circuitos neurais e para o controle da excitabilidade em nervos e células musculares, recebe o nome de inativação rápida, em que o canal cessa a condutância ao sódio ainda estando na sua conformação ativa. A região do canal de sódio responsável por este mecanismo é a curta alça intracelular que conecta os domínios homólogos III e IV na subunidade α .

2.4 Gânglio Cervical Superior e Canais de sódio dependente de voltage - Na_v

O GCS, faz parte do sistema nervoso periférico simpático. Este representa os gânglios de C1 a C4 da cadeia de gânglios simpáticos paravertebrais que sofreram fusão. A maioria dos gânglios paravertebrais transmite informações a partir da medula espinhal para integrar órgãos alvo, sem outras fontes de informação. Em geral gânglios paravertebrais têm pouca função autônoma e provavelmente não podem mediar diretamente reflexos periféricos (BERNE *et al.*, 2009).

O GCS está localizado na extremidade rostral da cadeia simpática paravertebral e contém um conjunto de neurônios que inervam diferentes órgãos situados em toda a cabeça. Estes grupos incluem neurônios que controlam regiões especializadas dos leitos vasculares cerebrais, músculo, glândulas salivares, íris e glândula pineal (LI e HORN, 2006).

Figura 2- Localização do gânglio cervical superior.



Fonte: Adaptado de Netter (2018).

Conforme Yokota *et al.*, (2018) o GCS faz parte do sistema nervoso autônomo (SNA) sendo este o gânglio mais superior da cadeia simpática e está disponível bilateralmente. Ainda sobre o GCS, este é o maior dos três gânglios do tronco simpático cervical, sendo os outros dois conhecidos como, gânglio estrelado e cervical médio.

De acordo com sua localização regional, os neurônios do GCS podem ser classificados como rostrais e caudais. Os neurônios rostrais projetam seus axônios através do nervo carotídeo interno e inervam a vasculatura cerebral, a glândula pineal, a íris, a pele e os vasos da cabeça rostral. Axônios de neurônios caudais deixam o gânglio através do nervo carotídeo externo e inervam as glândulas salivares, tireóide e a vasculatura da cabeça caudal (ELINOS *et al.*, 2018).

Embora exista uma variedade de tipos de N_{av} , o GCS é responsável por expressar o $N_{av}1.7$ e, em pouca quantidade o $N_{av}1.1$. Tais canais apresentam um papel importante na ocorrência dor neuropática. Outros tipos de N_{av} também têm despertado o interesse dos pesquisadores entre eles: $N_{av}1.3$, $N_{av}1.8$ e $N_{av}1.9$ que são encontrados em pequenos neurônios do GRD e, portanto, estão envolvidos também na geração e condução dos potenciais de ação nociceptivos (CAMPBELL e MEYER, 2006).

Quanto a presença dos N_{av} no GCS, a realização de uma análise imunocitoquímica revelou a presença de $N_{av}1.7$ nos neurônios do GCS. Também foi testado a presença do $N_{av}1.1$ em neurônios do GCS. Assim como relatado anteriormente, estes estão presentes em níveis mais baixos em neurônios GRD. Para confirmar a especificidade do canal-anticorpo, hipocampo e neurônios corticais foram usados em experimentos de controle e nenhuma imunorreatividade para $N_{av}1.7$ foi encontrada nesses neurônios. Assim, as correntes do $N_{av}1.7$ sensíveis ao TTX foram as correntes dominantes de Na em neurônios GCS (JIA, *et al.* 2008).

Alguns eventos relacionados à inflamação nos tecidos podem produzir alterações intracelulares nos neurônios e células gliais satélites do GCS, e portanto, possivelmente contribuir para mecanismos periféricos subjacentes à disseminação da dor orofacial (SESSLE, 2011).

Na realidade, os N_{av} permanecem inativos e fechados em repouso, mas

desenvolvem mudanças conformacionais e estruturais em resposta a despolarização inicial da membrana, causando um fenômeno cíclico de ativação ou abertura e fechamento dos canais durante o processo de transmissão sensorial fisiológica. A abertura transitória do Na_v permite o fluxo de íons sódio a favor do seu gradiente de concentração, promovendo uma corrente transmembrana de despolarização neuronal, levando a membrana axonal mais próxima ao limiar para geração do potencial de ação. A maioria dos Na_v é inativada rapidamente após sua abertura, sofrendo posteriormente mudanças conformacionais para um novo ciclo de ativação (CATTERALL; GOLDIN; WAXMAN, 2005).

Diante do apresentado anteriormente, os Na_v estão no foco do desenvolvimento recente de analgésicos, já que várias mutações foram identificadas em pacientes que sofrem de síndromes de dor hereditárias. Os Na_v , entre outros, localizados em neurônios sensoriais do sistema nervoso periférico. Os nociceptores, portanto, são neurônios sensoriais especializados, que detectam estímulos potencialmente prejudiciais da periferia ou dos órgãos internos e transduzem as informações através de longos neurônios para a medula espinhal (SCHRENK-SIEMENS; RÖSSELER; LAMPERT, 2018).

Os Na_v são considerados um dos principais alvos no desenvolvimento de novas terapias para melhorar o manejo da dor e neuropatias, uma vez que o disparo anormal de neurônios aferentes primários está associado a uma regulação desordenada desses canais. Alguns subtipos de Na_v , dentre eles o Na_v 1.7 e Na_v 1.8, são de maior interesse na dor devido à sua expressão seletiva nos nervos periféricos (DAS, 2015).

2.5 Gânglio cervical superior, Canal de Na_v e diabetes

Conforme apresentaremos a seguir, uma série de estudos já tem demonstrado que as propriedades elétricas neuronais em animais diabéticos podem sofrer alterações significativas podendo resultar em disfunção de órgãos ou de sistemas.

O trabalho de Campanucci, Krishnaswamy e Cooper (2010) estudando a transmissão sináptica nos neurônios do GCS de animais com DM, utilizou-se de

eletrodos intracelulares para registrar os potenciais excitatórios pós-sinápticos - PEPSs, observaram que nos gânglios dos ratos controle, um estímulo no nervo pré-gânglionar para evocar PEPS aumenta em magnitude ao longo do tempo. Em contra partida, o PEPS evocado nos neurônios dos ratos diabéticos foram significativamente deprimidos, com uma semana após o início do DM.

Ja conforme Hong *et al.* (2004), investigando a expressão e função dos canais para sódio dependentes de tensão elétrica, resistentes e sensíveis a tetrodotoxina, observaram um aumento na expressão dos Na_v1.3 (TTX-S) e Na_v1.7 (TTX-S), observa-se também a redução da expressão nos Na_v1.6 (TTX-S) e Na_v1.8 (TTX-R) no GRD de animais com DM. A maioria dos potenciais de ação registrados apresentaram uma “saliência” na fase de inclinação descendente, uma característica de neurônios nociceptivos correspondente ao tipo de fibra-C. Ainda no mesmo trabalho foi demonstrado que tanto a corrente de sódio TTX-S como TTX-R, foram potencializadas nos neurônios nociceptivo do GRD de animais com DM e os níveis de expressão dos subtipos de canais TTX-S e TTX-R foram diferencialmente afetados pelo DM.

Contudo, Campanucci, Krishnaswamy e Cooper (2010) demonstraram que a transmissão sináptica no GCS encontra-se alterada pelo DM. Essa alteração parece estar ligada à produção excessiva de alguns compostos. A transmissão sináptica apresenta-se diminuída já na primeira semana após a indução ao DM e progride de acordo com a evolução da doença.

O exame dos padrões de expressão gênica global em gânglios de ratos controle e diabéticos revelou diferenças marcantes na expressão gênica em neurônios do gânglio celíaco (GC) gânglio mesentérico superior (GMS) e do GCS sob condições de controle e em resposta ao DM. Neurônios do GC e do GMS dissociados em cultura demoram mais para iniciar o crescimento de neurites do que neurônios do GCS. Além disso, as atividades das enzimas antioxidantes são significativamente mais baixas em GC / GMS do que em GCS (SEMRA; SMITH; LINCOLN, 2004).

Cameron *et al* (2001) examinaram a evolução temporal das alterações na perfusão do GCS em ratos diabéticos induzidos por STZ. Uma semana após a indução do DM já causou um déficit de perfusão de 46%, que foi aumentando ate

54% ao longo de 24 semanas. Assim, observa-se que houve redução precoce, profunda e de longa duração na perfusão ganglionar podendo afetar de forma deletérica a função do corpo da célula neural e contribuir para a neuropatia autonômica.

Silva-Dos-Santos *et al.*, (2020) verificaram que em ratos induzidos ao DM via STZ, que ocorrem alterações dos parâmetros eletrofisiológicos passivos, tais como: o potencial de membrana em repouso (RMP), a resistência de entrada (R_{in}), a reobase, limiar do potencial de ação, amplitude e a duração do PA, assim como alterações no ascendente máximo (dV / dt_{asc}) e descendente (dV / dt_{desc}) de neurônios do GCS.

2.6 Simulação computacional dos canais Na_v

O desenvolvimento das técnicas de eletrofisiologia na primeira metade do século XX representou um grande avanço para a área de neurociências, permitindo uma melhor compreensão das propriedades elétricas de células excitáveis. Ao mesmo tempo a abordagem neurofisiológica passou a ser dividida em duas linhas sendo uma preocupada em observar as respostas e as propriedades das células conectadas ao sistema neuronal e a segunda utiliza a integração de conceitos biofísicos que buscam compreender os mecanismos dos canais iônicos (QUINOUD, 2016).

Com a criação da técnica de patch-clamp, facilitou a realização de registros das correntes elétricas com base nas vias de transporte e os potenciais elétricos em células isoladas. O emprego dessa técnica permitiu que os modelos teóricos fossem desenvolvidos para simulação de tais potenciais e correntes. O estudo dos canais iônicos passou a ter ainda maior importância devido a sua relação com algumas doenças (PROKS; ASHCROFT, 2009).

Um exemplo do citado anteriormente é que a atividade elétrica dos neurônios sensoriais periféricos está intimamente relacionada à sua capacidade de geração e condução de potencial de ação promovida pelos canais iônicos (ou ionóforos) de Na_v localizados ao longo da membrana axonal. Esse papel dos Na_v é essencial na eletrogênese neural e fez emergir um novo alvo importante para novas abordagens

terapêuticas com o objetivo de atenuar o disparo neural que resulta na resposta dolorosa (LIU; WOOD, 2011).

Graças aos avanços da ciência e da computação ocorridas na segunda metade do século XX, onde o avanço da capacidade e da velocidade computacional é cada vez maior, já é possível simular de forma eficaz uma variedade de processos biológicos partindo de dados já produzidos de forma experimental (NEVES, 2013).

Conforme Sundt *et al.* (2015) explicam que a simulação computacional do funcionamento neuronal é uma ferramenta valiosa para a compreensão da fisiologia das células do sistema nervoso. Para que essa simulação ocorra, é necessário ter um modelo que descreva satisfatoriamente o fenômeno que se deseja investigar. Uma vez que o modelo análogo elétrico da membrana neuronal esteja construído, é possível determinar as equações matemáticas que regem a sua dinâmica e, com essas equações, é possível utilizar simulações numéricas para a resolução das equações, seja elas em situações estacionárias ou dinâmicas.

Os trabalhos de Hodgkin e Huxley (1952) (modelo H-H), forneceram a base matemática para a simulação de propriedades elétricas das membranas neuronais. A partir desses foi possível obter satisfatoriamente o PA do axônio gigante de lula sendo importantes para comparar posteriormente com os dados de modelos simulados. Dessa forma, o modelo H-H é a base para construção de novos estudos que descrevam o comportamento das propriedades elétricas das células. Como exemplos, Sacchi *et al* (1998) e Sundt *et al.* (2015) que desenvolveram uma simulação computacional do PA dos neurônios do GCS de ratos utilizando como base o modelo H-H, que inicialmente envolveram seis fluxos de correntes iônicas.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Levando-se em consideração que a ocorrência de DM apresenta-se como um relevante e crescente problema de saúde em todo o mundo, sendo frequentemente associado aos altos custos com saúde. E que ao mesmo tempo autores como Campanucci, Krishnaswamy e Cooper (2010), Hong *et al.* (2004), Cameron *et al.* (2001), Silva-Dos-Santos *et al.* (2020) mostram em suas pesquisas que as alterações presentes nas complicações do DM possuem relação com a expressão/função dos canais iônicos, alterando o funcionamento dos Na_v .

Desta forma verificamos a necessidade de realizarmos maiores estudos a fim de conhecermos detalhes sobre a evolução dos casos de neuropatia diabética. Ressalta-se que o estudo da expressão/função dos canais iônicos questão exigem a realização de atividades experimentais. Na maioria dos casos, essas atividades necessitam de muito tempo para a sua realização, além de carecer de um amplo financiamento e recursos, bem como a utilização de animais.

O trabalho pioneiro introduzido no modelo H-H foi a base a criação de outros modelos matemáticos determinísticos, sendo úteis para o estudo do comportamento das condutâncias iônicas e das membranas nervosas. Com isso realizar a modelagem dinâmica das correntes de Na_v torna-se uma realidade.

Diante do exposto anteriormente, a realização deste estudo justifica-se pelo fato de que: a utilização de métodos alternativos de estudo dos Na_v através das simulações computacionais, apresenta-se como uma ferramenta importante para investigação de suas alterações. Além disso pode ainda ajudar a reduzir o tempo das atividades experimentais, bem como a diminuição dos recursos utilizados como o uso de animais.

Visto isto, este trabalho propõe utilizar uma ferramenta alternativa para o desenvolvimento de simulações das correntes de Na^+ . Por meio desta, será permitido que o nosso estudo possa observar o que ocorre com os sinais eletrofisiológicos de forma simulada e comparar com valores de dados experimentais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Investigar as correntes de Na⁺ dependentes de voltagem de animais controle e diabéticos induzidos por estreptozotocina e realizar a simulação computacional dessas correntes.

4.2 Objetivos específicos:

- Registrar as correntes de Na⁺ dependentes de voltagem do GCS de animais controle e com DM induzida por estreptozotocina;
- Simular as correntes de Na⁺ dependentes de voltagem do GCS de animais com base nos dados coletados em laboratório.
- Comparar os dados simulados com os dados experimentais obtidos no GCS dos animais controle e DM para fazer ajustes no modelo;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais experimentais e a indução do diabetes

Os dados experimentais das correntes iônicas foram obtidos por meio da técnica do patch clamp em neurônios dissociados do GCS de ratos controle e ratos com diabetes induzido por STZ. Foi utilizada a espécie *Rattus norvegicus* da variedade *Wistar* (ambos os sexos) que foi fornecida pelo Biotério Central do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da UECE. O manuseio e a utilização desses animais obedeceram às normas estabelecidas pelas diretrizes para cuidados com animais de experimentação da UECE, sendo que esse projeto obteve aprovação junto ao comitê de ética em pesquisa animal da UECE através do protocolo 080921131/2020.

Como modelo escolhido para a indução do diabetes, foi utilizado a substância Estreptozotocina (conhecida pela abreviatura de STZ, do inglês) no qual a indução foi realizada já na fase adulta do animal (4ª semana de vida). Os animais foram mantidos em jejum por 8h e, em um grupo de animais (grupo diabetes - DM) foi injetada STZ (65 mg/kg via i.p.) diluída em citrato de sódio (100 mM, pH ajustado para 4,5). O segundo grupo (grupo controle - CT) recebeu somente a solução veículo em volume equimolar.

Esse modelo de indução do DM é utilizado em animais devido a dois fatores descritos por Wei *et al* (2003) e Arulmozhi *et al* (2004) sendo eles: o primeiro é a proximidade que o modelo oferece em relação à doença em seres humanos. Já o segundo é que pode ser utilizado para indução do diabetes tipo I.

Nos dois grupos experimentais, os valores glicêmicos foram monitorados semanalmente, sempre no mesmo dia e horário, através da coleta de um pequeno volume de sangue pela cauda e determinação da glicemia por glicosímetro (Accu Check, Roche Diagnostics). Após a confirmação da indução do diabetes pela medida da glicemia (glicemia acima de 200 mg/dL de sangue), os animais foram colocados em caixas coletivas e separados em seus respectivos grupos. Os animais foram mantidos por 8 semanas após a indução do DM. Já na 12ª semana de vida, os

animais foram devidamente anestesiados para a realização da eutanásia e posteriormente a dissecação para a retirada dos GCS.

Para obtenção dos neurônios individuais, os GCS's foram acondicionados em solução salina balanceada de Hank zero-Ca²⁺/Mg²⁺ (HBSS, em mM: NaCl 137,93; KCl 5,33; KH₂PO₄ 0,44; NaHCO₃ 4,0; Na₂HPO₄ 0,3 e glicose 5,6) seguida por solução de colagenase tipo I (1,0 mg/ml) e dispase grau II (1,0 mg/mL) durante 75 minutos e tripsina (2,5 mg/ml) por 15 minutos, ambas em HBSS em banho-maria a 37°C. Após as soluções de dissociação, os neurônios do GCS foram separados dos tecidos adjacentes por uma suave trituração em meio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM). A esse meio, foi acrescentado 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de estreptomicina e 0,1 mg/ml de penicilina. Os neurônios foram plaqueados em lamínulas tratadas com Poli-DLisina 0,01%, incubados em ar atmosférico saturado com 5% CO₂, mantidos a 37°C e utilizados no período de 8 a 48 h.

5.2 Registro eletrofisiológico com a técnica de patch clamp

Os aspectos funcionais e eletrofisiológicos dos canais Na⁺ do grupo CT e grupo DM foram obtidos através da técnica de patch clamp.

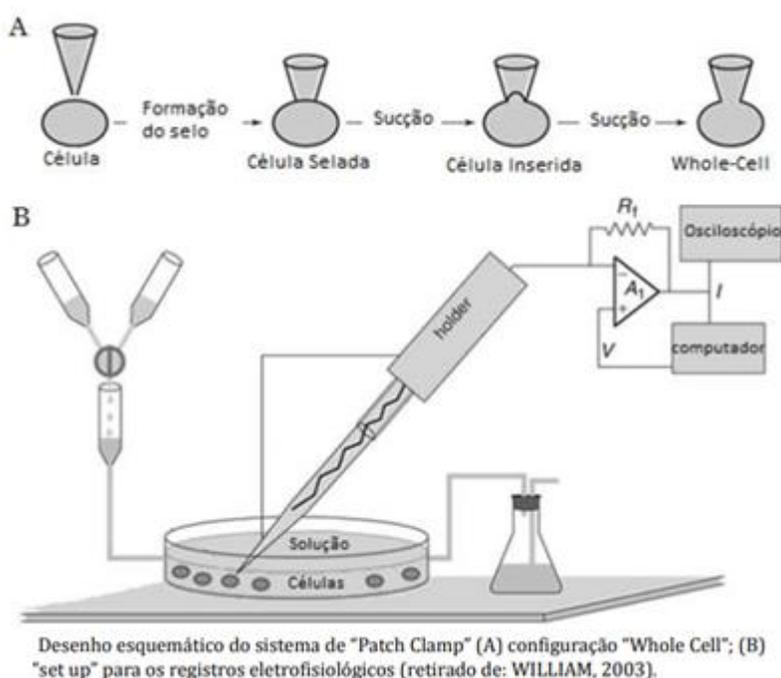
Os protocolos de estimulação, de registro e análise dos dados foram pré-programados e gerados por um software em computador (PCLAMP versão 10, Axon Instruments) e os dados armazenados em computador por um sistema de conversão analógico/digital e aquisição de dados (modelo Digidata 14400, Axon Instruments, Foster City, CA, EUA). Ressalta-se que a mensuração dos registros eletrofisiológicos da técnica de Patch Clamp foi realizada na configuração de célula inteira conhecida como modo Whole Cell utilizando-se um amplificador de Axopatch 200B. O registro das correntes iônicas foi feito com pipetas de vidro Flint (Perfecta, SP, Brasil) com resistência de ponta entre 1,5 e 3,0 MΩ e preenchidas com solução que possibilitasse o isolamento da corrente iônica apropriada à finalidade do experimento.

A solução que banhou a célula mimetizou a concentração eletrolítica do meio extracelular, com ajustes apropriados. A capacitância da célula, bem como a resistência de acesso, foi compensada (60 - 90%) pelos circuitos próprios do

amplificador e as subtrações das correntes capacitivas e de vazamento nos registros foram retiradas utilizando o protocolo de subtração P/4 (BEZZANILLA & ARMSTRONG, 1977). De forma a registrar a ativação e/ou inativação das correntes iônicas, foi aplicado protocolos de pulsos de potencial, ou voltagem, à célula. Nesses protocolos, o valor da voltagem foi clampeada (isto é, fixada) em valores pré-determinados e coletados os valores das correntes iônicas devido a esses valores de voltagem.

Para o registro das correntes de Na^+ , a solução externa teve a substituição dos íons K^+ por Colina, redução da concentração de Ca^{2+} e o acréscimo de TEA e Cd, que são bloqueadores dos canais de K^+ e Ca^{2+} , respectivamente.

Figura 3: Modelo de Patch Clamp.



5.3 Modelos Neurais e Simulação Computacional

A modelagem computacional do potencial de ação nos axônios teve início com os trabalhos de Hodgkin e Huxley (1952) no qual as pesquisas buscavam a determinação de um modelo baseado em dados experimentais do potencial de ação

no axônio gigante de lula durante a primeira metade do século XX. Quinaud (2016) destaca que o modelo apresentado anteriormente, fornece a base da maioria dos modelos subsequentes de potenciais de ação e também de modelos de fluxo de corrente através de canais iônicos.

Para este estudo, a simulação foi baseada em dois modelos análogos elétricos da membrana sendo estes: o modelo de Hodgkin e Huxley (Modelo H-H, 1952) e o modelo de Sacchi *et al.* (1998), proposto para os neurônios do GCS. Estes modelos ao serem utilizados levam em conta as propriedades passivas e ativas da membrana celular e, embora o modelo H-H seja a base para o modelo de Sacchi e colaboradores, ele foi utilizado inicialmente para a construção da idéia do análogo elétrico de membrana e como as alterações propostas tornam as simulações mais próximas dos dados experimentais para o GCS.

No que diz respeito às simulações, utilizamos um modelo simplificado de célula, onde os neurônios foram modelados como estruturas esféricas, de volume e forma bem definidos, e com membrana com características isotrópicas, isto é, que apresenta as mesmas propriedades físicas e químicas, independente da direção considerada. Os meios intracelular e extracelular foram considerados isopotenciais, isto é, possuem o mesmo valor de potencial elétrico quando medido em dois pontos diferentes no mesmo meio. Dessa forma, toda a variação de potencial elétrico será investigada sobre a membrana celular. Levamos em consideração ainda os análogos elétricos de membrana onde existe um elemento capacitor de membrana (C_m) em paralelo com condutâncias e baterias (fontes de voltagem). Já o modelo H-H utiliza duas condutâncias ativas (a condutância ao Na^+ e ao K^+) e uma passiva (uma condutância de vazamento). Como relação ao modelo de Sacchi *et al.* (1998) envolveu o uso de cinco condutâncias ativas (uma de Na^+ , uma de Ca^{2+} e três tipos diferentes de condutâncias ao K^+) e duas condutâncias passivas (uma associada ao vazamento e outra ao K^+).

No próximo passo foi a realização das simulações, para isso utilizamos um computador com configuração que permitissem um bom desempenho e rapidez nas simulações. A configuração utilizada foi processador Intel® Celeron Core I3 8ª geração 1,10 GHz, 8,00 GB de memória RAM e 1 TB de memória ROM. Utilizamos

ainda uma plataforma para as simulações conhecido como Dev-C++ versão 6.30, sendo este um software que oferece um ambiente de desenvolvimento integrado para o desenvolvimento de aplicações. Este programa foi utilizado para aprendizado inicial dos conceitos de programação e para a resolução das equações dos modelos análogos elétricos dos neurônios, logo ele apresenta todas as funcionalidades e padrões necessários para a escrita, compilação, debugging e execução de programas na linguagem C e C++.

Uma vez realizadas as simulações, estas foram geradas com os códigos em linguagem C e comparadas entre os diferentes modelos (H-H e Sacchi) e com diferentes incrementos de tempo. Além do mais, foram feitas modificações nas condutâncias individuais, para verificar qual a influência dessas condutâncias na atividade elétrica dos neurônios.

5.4 Comparação dos dados simulados com os registros eletrofisiológicos experimentais

Uma vez que os dados simulados na linguagem C foram obtidos, eles foram comparados com os dados experimentais. Para isso, utilizamos os dados de registros eletrofisiológicos das correntes iônicas dos neurônios do GCS. Estes dados foram coletados e fornecidos através de colaboração com o Laboratório de Eletrofisiologia - LEF, do Instituto Superior de Ciências Biomédicas - ISCB, da Universidade Estadual do Ceará, Campus Itaperi - Fortaleza.

Ao adquirirmos os dados experimentais, eles foram comparados com os dados simulados utilizando uma alternativa ao método dos mínimos quadrados (ABDI, 2007). Vale ressaltar que este método procura realizar o melhor ajuste para um conjunto de dados minimizando a soma dos quadrados da diferença entre o valor simulado juntamente com o valor encontrado experimentalmente. Contudo, uma das premissas é que os dados simulados apresentem uma dependência linear. Como os dados das correntes iônicas são dados não lineares, também foi necessário utilizar métodos alternativos, como a transformação de dados não lineares em lineares e, assim, proceder com a utilização do método

5.5 Análise estatística

Inicialmente, os dados das simulações computacionais e experimentais foram testados e separados em variáveis paramétricas e não-paramétricas. Para as variáveis classificadas como paramétricas, os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e para variáveis não-paramétricas como média \pm desvio padrão. O número de experimentos está denotado pela indicação “n”. Para a análise de diferença estatística entre grupos (dados experimentais e simulados na situação controle e diabetes) foi utilizado o teste t de Student sendo o nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

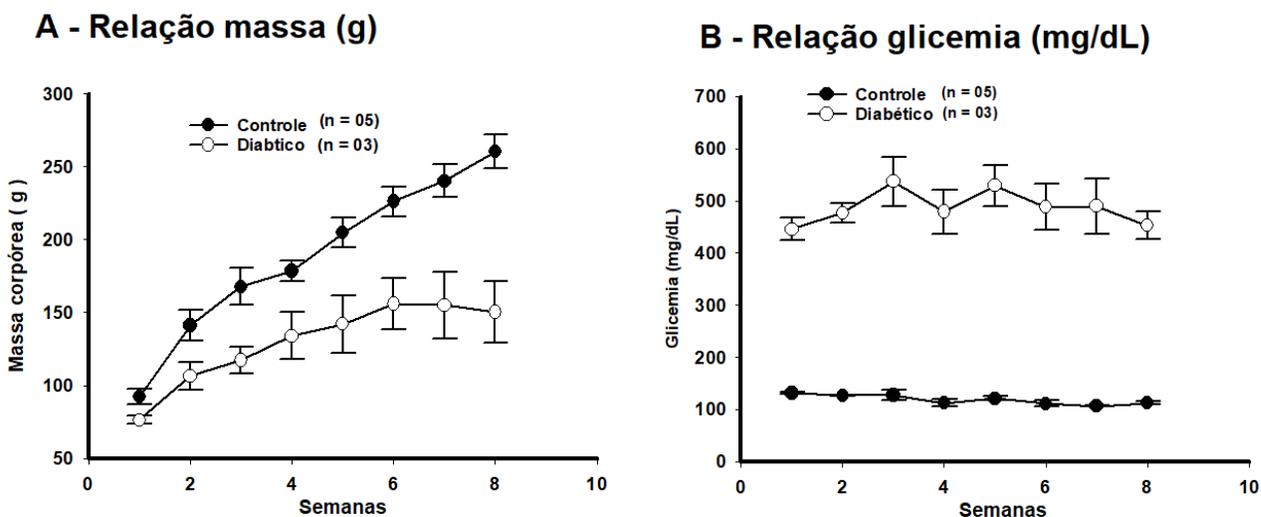
A tabulação, os gráficos e as análises estatísticas dos dados foram realizados por uma combinação de software e programas: SigmaPlot 14.5 (Systat, CA, EUA), Excel 365 (Microsoft, Washington D.C., EUA) e Pclamp 10.6 (Axon Instruments, CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização do modelo animal

Inicialmente, realizamos a caracterização dos parâmetros metabólicos da indução do diabetes nos animais. A figura 4 no painel (A) apresenta a evolução da massa corpórea (g), dos animais do grupo CT com o grupo DM. Já o painel (B) faz a relação entre a Glicemia (mg/dL) dos animais do grupo CT com os animais do grupo DM. Ressalta-se que a figura apresenta as 08 semanas de observação após a indução do DM.

Figura 4: Relação entre a Massa corpórea e Glicemia dos animais controle e diabéticos (Painel A – massa corpórea (g); Painel B – glicemia (mg/dL)). Os dados estão expressos com média \pm E.P.M. e o “n” representa o número de animais utilizados.



Conforme visto na figura, verificamos que ao longo das 08 semanas de observação, os animais do grupo CT (n = 05), apresentaram um aumento gradual da massa corpórea chegando a $260,30 \pm 11,82$ g, enquanto que a massa corpórea dos animais grupo DM (n = 03) chegou a $150,34 \pm 21,31$ g, permanecendo assim significativamente menor quando observamos os dados em relação ao grupo CT.

Quando comparado a massa dos animais na última semana, verificamos que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste-t de Student).

Com relação ao painel B da figura 4, ela apresenta a relação de concentração de glicose - mg/dL- medida na cauda dos animais durante as 08 semanas de observação. Podemos verificar que os níveis de glicose do grupo DM manteve-se elevado em todo o tempo da pesquisa com valores em torno de 450 mg/dL, o que caracteriza que de fato os animais estavam com DM.

Já quanto ao grupo CT apresentado, verificamos que os níveis de glicose mantiveram-se estáveis sempre com variações próxima de 100 mg/dL. Ao compararmos os valores da glicose no grupo CT e no grupo DM ao final da 8ª semana, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$, teste-t de Student). A evolução completa da relação entre a massa e a glicemia tanto do grupo CT quanto do grupo DM estão apresentados na tabela 01.

Tabela 1: Dados da massa corpórea e glicemia dos grupos CT e DM observados durante as semanas de evolução e após a indução do diabetes.

Semanas	Massa (g)/CT	Massa (g)/DM	Glicemia (mg/dL)/CT	Glicemia (mg/dL)/DM
1	92,13 ± 5,23	76,28 ± 2,74	131,60 ± 2,29	445,67 ± 21,65
2	141,11 ± 10,57	106,56 ± 9,35	127,00 ± 1,22	477,00 ± 19,14
3	167,75 ± 12,65	117,3 ± 9,21	127,5 ± 9,13	537,00 ± 47,47
4	178,35 ± 7,25	134,08 ± 16,04	112,80 ± 6,57	479,33 ± 42,31
5	204,65 ± 10,24	142,13 ± 19,63	121,00 ± 3,94	529,00 ± 39,63
6	226,14 ± 10,26	155,97 ± 17,84	111,20 ± 5,74	488,33 ± 44,09
7	240,18 ± 11,36	154,96 ± 23,17	106,60 ± 1,63	490,00 ± 53,52
8	260,38 ± 11,82	150,34 ± 21,31*	112,60 ± 2,66	453,00 ± 25,97*

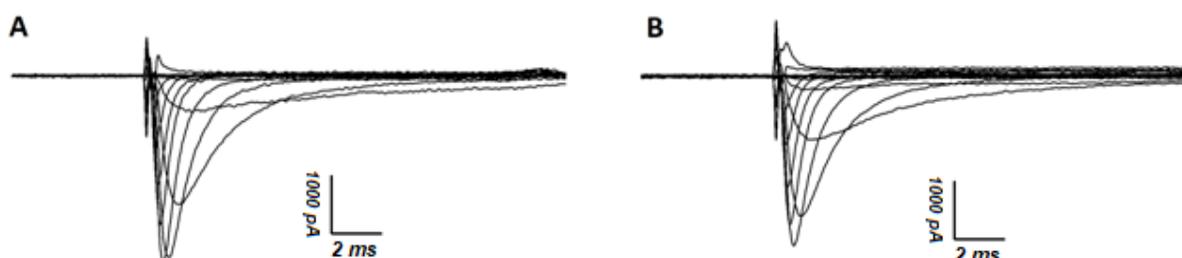
*: diferença estatística comparado ao grupo controle ($P < 0,05$, teste-t de Student).

6.2 Curvas de ativação da corrente de Na⁺ do GCS

Após as 12 semanas de vida do animal, foi realizada a eutanásia e retirado o tecido alvo no qual foi dissociado o GCS, e em seguida realizados os registros eletrofisiológicos das correntes de Na⁺. Ao avaliarmos a ativação das correntes Na⁺

dos animais dos grupos CT e DM verificamos que houve uma redução das amplitudes da corrente no grupo DM conforme podemos observar. A figura 5 apresenta os traçados representativos que foram utilizados na apresentação.

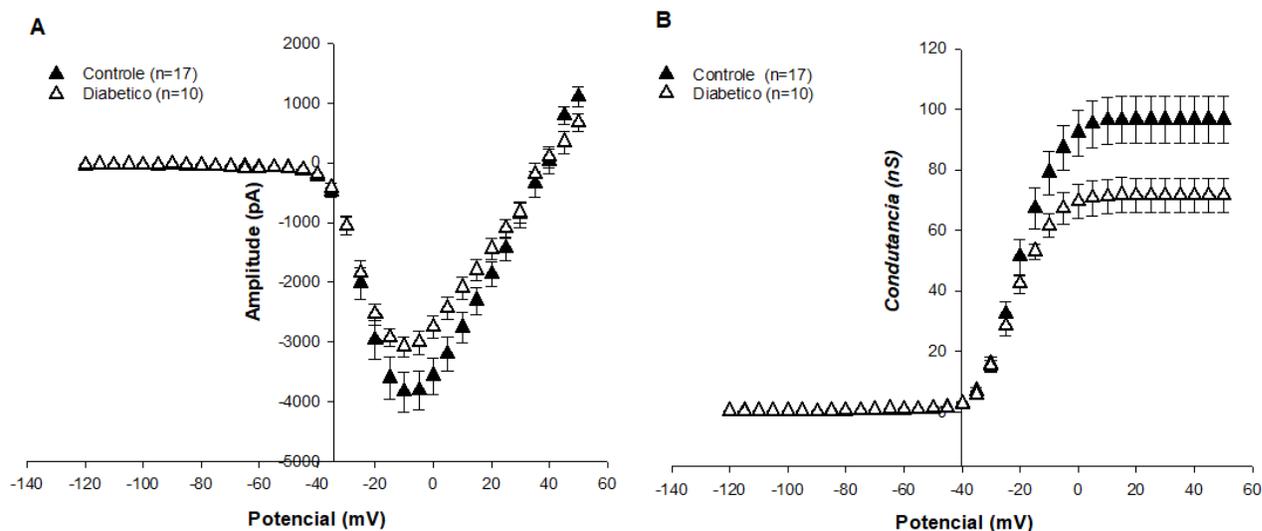
Figura 5: Traçados representativos da ativação das correntes de Na⁺ nos animais dos grupos controle (painel - A) e diabético (painel - B).



Os traçados representativos mostram as características do formato da corrente de Na⁺ que surgiram durante a experimentação. Entre os principais aspectos destaca-se a deflexão para baixo e que alcança elevados valores de amplitude quando comparados com de outros tipos de correntes.

Analisando os picos das correntes no protocolo de corrente-voltagem, foi possível verificar que houve a redução da amplitude da corrente de Na⁺ no grupo DM em comparação com o grupo CT, conforme observamos na figura 6 painel (A). Com relação à condutância ao Na⁺ as curvas dos animais dos grupos CT e DM estão apresentadas na figura 6 (painel - B).

Figura 6: Relação I-V da ativação da corrente de Na⁺ e condutância máxima (painel A – Relação I-V; Pannel B – Condutância máxima)



Diante do exposto na figura 6 painel (A) é possível verificar que a amplitude de corrente grupo DM é de $-3075,95 \pm 167,77$ pA ($n = 10$), enquanto que o grupo CT aparece com pico de $-3843,49 \pm 342,35$ pA ($n = 17$), sendo assim verifica-se que existe uma diferença de 768 pA entre os grupos analisados. Com base no disposto anteriormente não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$, teste-t de Student), entretanto, é possível observar que ocorreu uma alteração entre as correntes analisadas entre os grupos CT e DM.

Sobre a análise da condutância máxima apresentada na Figura 6 painel (B), verificamos que o grupo DM apresenta-se com valor de $71,15 \pm 5,76$ nS ($n = 10$), enquanto que o grupo CT mostra com $96,41 \pm 7,74$ nS ($n = 17$), ou seja houve uma redução significativa entre os grupos verificados. Sobre análise estatística houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$, teste-t de Student).

Tabela 2: Dados da ativação da corrente de Na⁺ no GCS

Parâmetro	Controle (n=17)	Diabético (n=10)
Pico I _{Na} (pA)	-3843,49 ± 342,35*	-3075,95 ± 167,77*
V _{1/2} – IV (mV)	-20,33 ± 1,42	-22,69 ± 1,01
K – IV (ms)	5,81 ± 1,01	5,35 ± 0,21
E _{Na⁺} (mV)	38,40 ± 0,15	40,67 ± 1,82
G _{max} (nS)	96,41 ± 7,74*	71,15 ± 5,76*
V _{1/2} –G _{max} (nS)	-20,70 ± 1,14	-19,23 ± 1,49
K –G _{max} (ms)	6,05 ± 0,16	7,00 ± 0,64

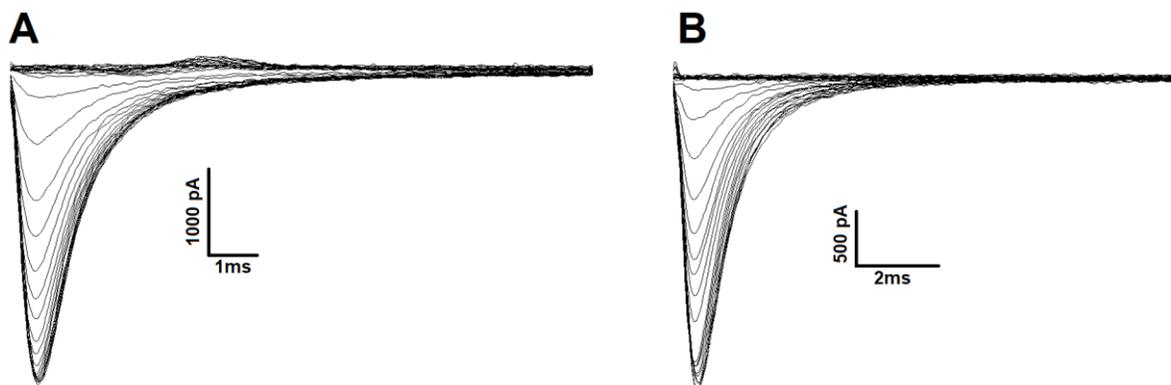
*: diferença estatística comparado ao grupo controle (P < 0,05, teste-t de Student).

Analisando os dados da ativação da corrente de Na⁺ nos neurônios do GCS na tabela 2, verificamos que o V_{1/2} das IV's apresenta-se no grupo CT com -20,33 ± 1,42 mV (n = 17) enquanto que no grupo DM com -22,69 ± 1.01mV (n = 10). Sobre o constante de inclinação K da curva da IV, o grupo CT apresenta 5,81 ± 1,01 ms (n = 17) enquanto que o grupo DM mostra valores 5,35 ± 0,21 ms (n = 10). Com relação ao E_{Na⁺} o grupo CT 38,40 ± 0,15mV (n = 17) enquanto que o grupo DM com 40,67 ± 1,82mV (n = 10). Os valores de V_{1/2} da curva de ativação G_{max} para o grupo CT é de -20,70 ± 1,14 nS (n = 17) e para o grupo DM é de -19,23 ± 1,49 nS (n = 10), e por último os dados de K na curva do G_{max} para o grupo CT aparecem com 6,05 ± 0,16 ms (n = 17) e para o grupo DM 7,00 ± 0,64 ms (n = 10). Com isso de acordo com a análise dos grupos V_{1/2} das IV, K-IV, E_{Na⁺}, V_{1/2} de G_{max} e K-G_{max} não mostraram diferença estatística significativa (p > 0,05, teste-t de Student).

6.3 Curvas da inativação da corrente de Na⁺ do GCS

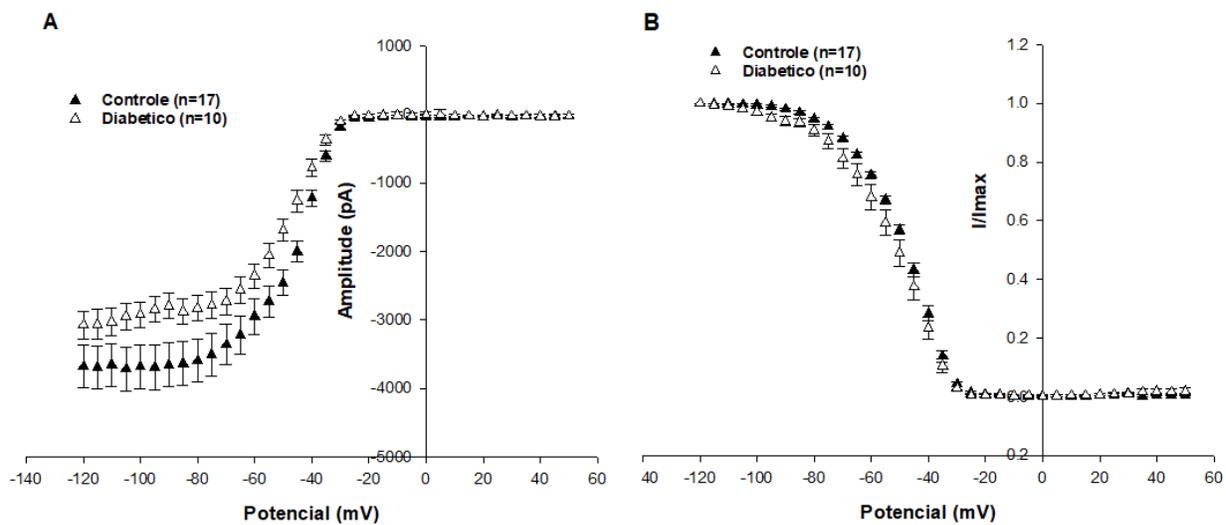
Com relação à inativação da corrente de Na⁺, a figura 7 apresenta o traçado representativo do grupo CT (painel - A). Vale destacar que esta apresenta-se com amplitude mais elevada quando comparada com o grupo DM (painel - B).

Figura 7: Traçados representativos da inativação das correntes de Na^+ nos animais controle - Painel (A) e diabético - Painel (B).



De acordo com o gráfico analisado verificamos que o pico da amplitude das correntes apresentam-se maiores no grupo CT com $-3888,1 \pm 322,56$ pA ($n = 17$) enquanto que o grupo DM apresenta com $-3036,41 \pm 128,00$ pA ($n = 10$). Embora tenhamos verificado que existe uma diferença dos valores entre os grupos, estes não apresentam diferença estatística significante ($p > 0,05$, teste-t de Student).

Figura 8: Relação I-V da inativação da corrente de I_{Na^+} e razão $I/I_{\text{máx}}$ (painel A – Relação I-V; Painel B – razão $I/I_{\text{máx}}$)



Sobre os dados relativos ao $V_{1/2}$ da corrente o grupo controle, apresenta-se com $-48,37 \pm 0,69$ mV ($n = 17$) enquanto que o grupo DM $-50,49 \pm 1,02$ mV ($n = 10$). O próximo dado analisado foi a K da curva IV que se mostrou da seguinte forma: para o grupo CT $8,43 \pm 0,17$ ms ($n = 17$) enquanto no grupo DM, o valor foi de $9,02 \pm 0,41$ ms ($n = 10$). Nos dois casos tanto nos dados relativos ao $V_{1/2}$ quanto no K da curva IV não mostraram diferença estatística significativa ($p > 0,05$, teste-t de Student).

Tabela 3: Dados da inativação da corrente de Na⁺ no GCS.

Parâmetro	Controle (n=17)	Diabético (n=10)
Pico Ina(pA)	$-3888,1 \pm 322,56$	$-3036,41 \pm 128,00$
$V_{1/2}$ -IV(mV)	$-48,37 \pm 0,69$	$-50,49 \pm 1,02$
K-IV(ms)	$8,43 \pm 0,17$	$9,02 \pm 0,41$

6.4 Simulação das correntes de Na⁺ do GCS e comparação com os dados experimentais

Após as análises dos dados experimentais, realizamos a simulação das correntes de Na⁺ utilizando como base as equações em um programa na linguagem C/C++. A modelagem teve como base as as equações utilizadas por Belluzzi e Sacchi (1991 e 1998). Os dados iniciais aplicado nas simulação pode ser encontrados na tabela 4.

Tabela 4: Dados da literatura para a simulação das correntes de Na⁺ do GCS

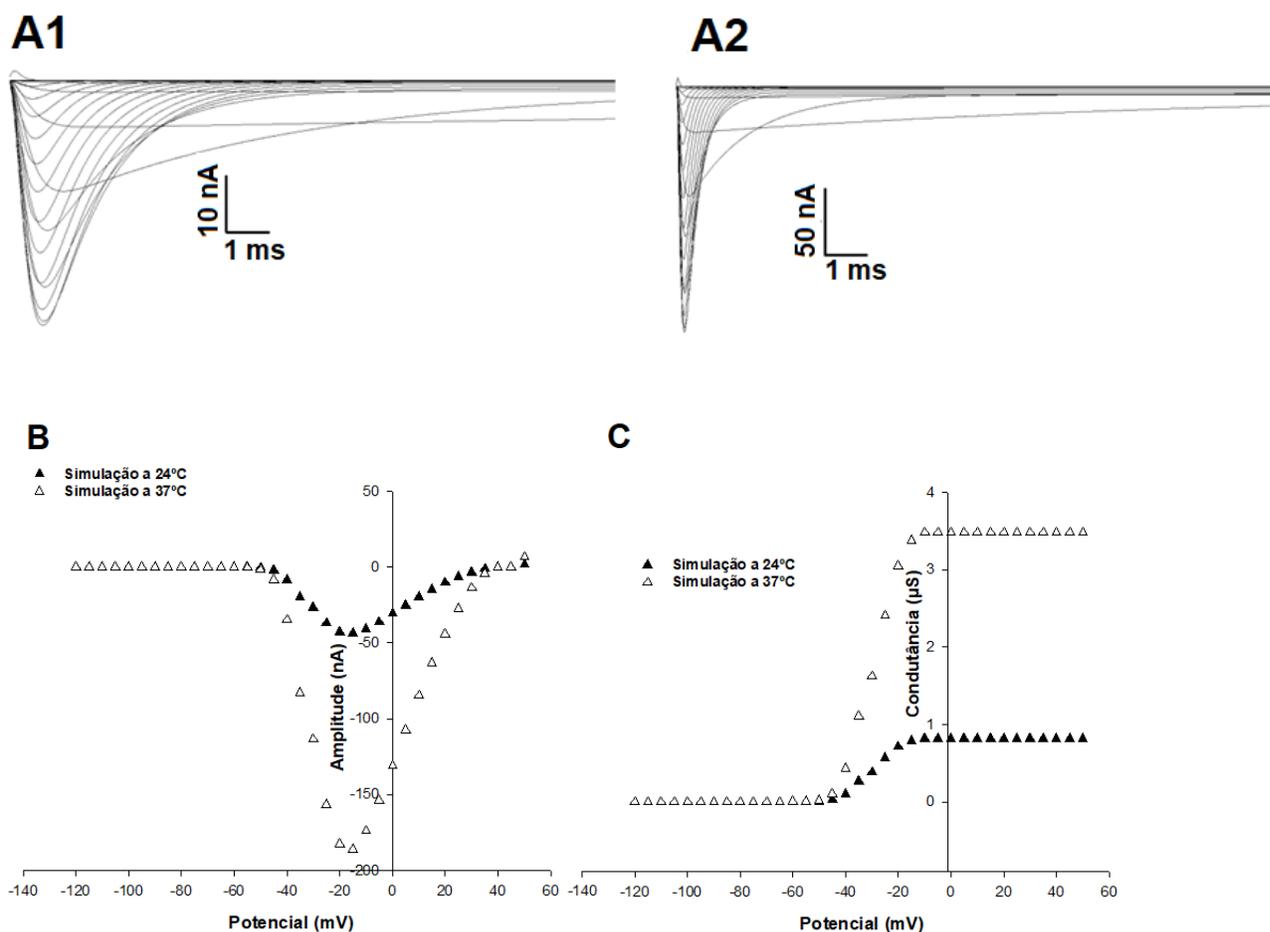
Parâmetro	Valor
Temperatura (°C)	24°
$V_{1/2}$ da partícula m de ativação (mV)	-36,0
k da partícula m de ativação (ms)	7,2
Condutância máxima (μS)	9,28
$V_{1/2}$ da partícula h de inativação (mV)	53,2
k da partícula h de inativação (ms)	6,5
Potencial de reversão do Na ⁺ (mV)	40,0

Incremento de tempo dt (ms)	0,01
Incremento de voltagem dv (mV)	5,0

Fonte: Belluzzi e Sacchi (1991 e 1998).

Após realizar as simulações com os parâmetros apresentados anteriormente, seguimos com a obtenção dos traçados representativos das correntes, assim como os demais parâmetros para análise como a curva da IV e a curva da condutância máxima que se encontram na figura 9.

Figura 9: Traçados simulados da corrente de Na⁺ do GCS (Painel A - traçados representativos A1- 24C°; A2-37C°; Painel B - Curva I-V; Painel C - Curva da condutância máxima).



Em relação a escolha da temperatura para realizar as simulações computacionais, os mesmos foram utilizados como valores de referência apresentados na literatura. Desta forma a temperatura de 24°C faz uma alusão a temperatura ambiente do laboratório em que são realizados os estudos experimentais. Já quanto a temperatura de 37°C, foi um parâmetro utilizado que faz referência a temperatura corporal em que ocorrem os processos fisiológicos.

O painéis A1 e A2 da figura 9 apresentam os traçados representativos que obtivemos por meio das simulações com temperatura de 24°C e 37°C respectivamente. Entre as principais características das mesmas destacamos que: o painel A1 apresenta amplitude menor. Além disso, ocorre também uma alteração da cinética da corrente, sendo esta mais lenta que quando comparadas em relação ao painel A2.

Já no painel B apresentamos a relação da curva corrente-voltagem IV dos dados simulados, entre as principais características podemos verificar que ocorre uma variação nas amplitudes da corrente. Logo, o dado simulado na temperatura de 24°C apresenta amplitude de -50 nA enquanto que a simulação realizada a 37°C chega a -190 nA. O painel C faz uma análise das condutâncias observadas no qual podemos destacar que também ocorre uma variação entre a condutância dos grupos, a simulação que ocorreu a 37°C se apresenta com 3,5 μS , enquanto que a simulação que ocorreu a 24°C encontra-se com 0,8 μS .

Com base nos dados encontrados nos grupos experimentais CT e DM, e também levando em consideração os parâmetros propostos por Belluzzi e Sacchi (1991 e 1998), realizamos a substituição de algumas das medidas utilizadas nas equações a fim de realizar ajustes e reproduzir de maneira simulada as curvas encontradas nos grupos experimentais CT e DM. A tabela 05 apresenta as alterações propostas para a curva de ativação.

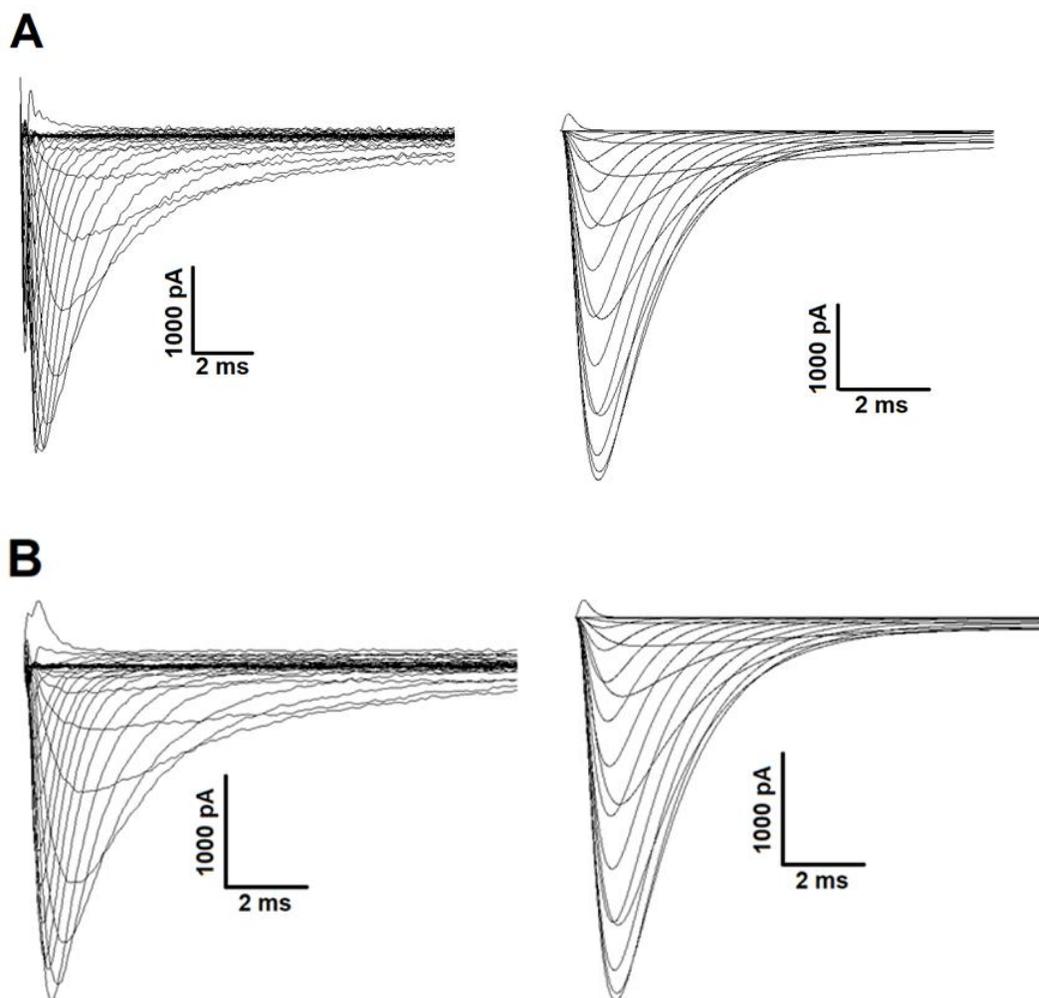
Tabela 5: Alteração dos parâmetros de ativação da simulação para comparação com os dados experimentais do grupo controle

Parâmetro	Experimento CT	Simulado CT	Experimento DM	Simulado DM
Pico I _{na} (pA)	-3843,49	-3807,8	-3075,95	-2876,9
V _{1/2} – IV (mV)	-20,33	-30,0	-22,69	-29,0
K – IV (ms)	5,81	7,2	5,35	6,35
E _{na} (mV)	38,40	40,0	40,67	40,0
G _{max} (nS)	96,41	1090,0	71,15	700
V _{1/2} – G _{max} (nS)	-20,70	48,2	-19,23	48,2
K –G _{max} (ms)	6,05	6,5	7,00	6,5

Conforme podemos verificar na tabela 5 as principais modificações realizadas foram do V_{1/2} que apresentou-se mais hiperpolarizado. O valor de V_{1/2} da ativação no CT partiu de -20,33 para -30,0 mV nos dados simulados do grupo DM. Com isso conseguiu-se reproduzir valores próximos nos picos da corrente de Na⁺. O destaque fica para o grupo Experimento CT e Simulado CT que tiveram a menor variação. Outros achados também apresentam modificações mínimas foram os padrões do G_{max} e do K-G_{max} que são semelhantes quando observados os grupos experimento CT x simulado CT com experimento DM e simulado DM.

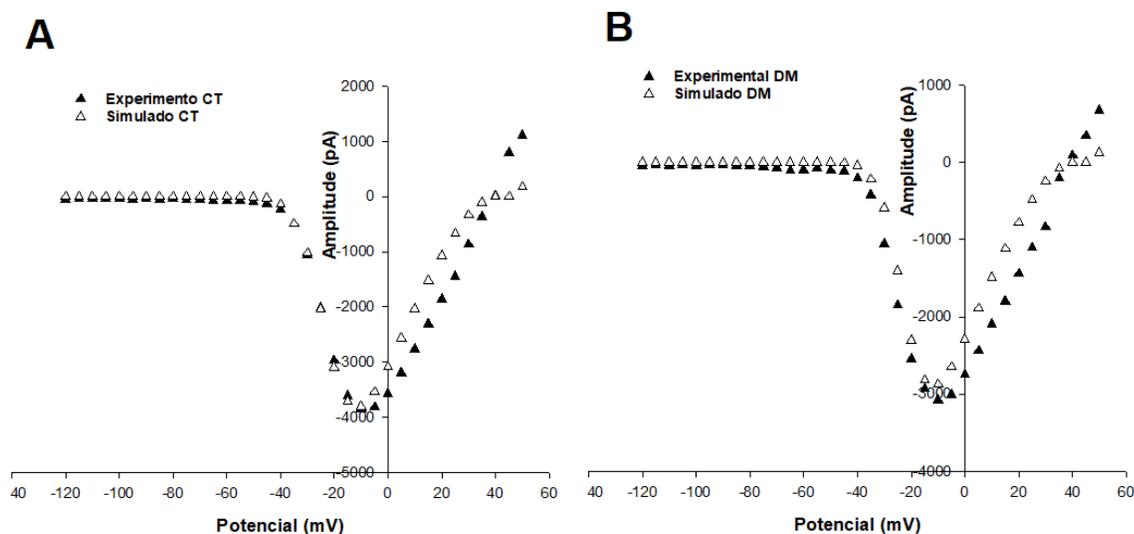
Após realizarmos a modificação dos valores e verificar que ocorre uma similaridade nos padrões das curvas IV, realizamos então a comparação dos traçados representativos para análise do comportamento das correntes. A figura 10 apresenta a comparação dos traçados representativos entre os dados experimentais com os simulados tanto dos grupos CT como DM.

Figura 10: Comparação dos dados simulados com os experimentais do grupo controle. Painel A - Traçado representativo Experimento CT - Simulado CT. Painel B – traçado representativo Experimento DM - Simulado DM.



Na análise dos traçados representativos, o painel A, faz a relação entre o grupo experimental CT e o Simulado CT, com isso verificamos que mostram características semelhantes tanto na amplitude quanto na cinética da corrente ao longo do traçado. Da mesma forma o painel B que mostra a relação dos traçados entre os grupos experimental DM e simulado DM apresentam características semelhantes entre si. Já com relação I-V da ativação da corrente de Na^+ encontra-se disposto a seguir na figura 11.

Figura 11: Relação I-V da ativação da corrente de Na⁺. Painel A - Grupo CT e Simulado CT; Painel B Grupo DM e Simulado DM.



Ao observarmos os dados do painel A, este faz a relação entre os dados obtidos com o grupo do experimento CT com os dados simulados do grupo CT. Verificamos com isso a similaridade nos padrões da curva assim como a proximidade do pico da IV sendo ela de: -3843,49 pA no experimento CT e de -3807,8 pA para o simulado CT. Já no painel B a relação entre o experimental DM apresenta-se com -3075,95 pA enquanto que no simulado DM apresenta -2876,9 pA, vale destacar ainda que o traçado da curva ocorre de maneira uniforme durante as variações da amplitude da corrente.

Ao finalizarmos a parte de análise dos padrões de ativação da IV, seguimos com a análise dos dados da inativação da corrente de Na⁺ para melhor compreendermos o comportamento da mesma nos dados experimentais e simulados. Após realizar a simulação com as variáveis utilizadas, estas estão apresentadas na tabela 6 para melhor compreensão.

Tabela 6: Alteração dos parâmetros de inativação da simulação para comparação com os dados experimentais do grupo controle.

Parâmetro	Experimento CT	Simulado CT	Experimento DM	Simulado DM
Pico I_{Na} (pA)	-3888,1	-3594,4	-3036,41	-2940,9
$V_{1/2} - IV$ (mV)	-48,37	55,0	-50,49	60,0
$K - IV$ (ms)	8,43	6,5	9,02	6,5

Como podemos verificar que os parâmetros utilizados no $V_{1/2}$ das IV sofreram algumas variações sendo de: -48,3 mV para o grupo experimento CT, -55,0 mV para o grupo simulado CT, -50,49 mV no grupo experimento DM e de 60,0 mV no grupo simulado DM. Sobre os dados de k da curva IV o valor de 6,5 ms foram os mesmos para os grupos simulado CT e simulado DM, enquanto que o grupo Experimental CT apresentou 8,43 ms e o grupo experimento DM 9,02 ms. Com isso conseguimos manter o mais próximo possível os picos das correntes de Na^+ com -3888,1 pA no experimento CT e -3594,4 pA no Simulado CT. Já os valores de experimento DM foram de -3036,41 pA e de -2940,9 pA no simulado DM.

Na análise dos traçados representativos merece destaque a relação entre os traçados de Inativação do grupo experimento CT com do Simulado CT. Nesse caso ocorre alteração da cinética da corrente com amplitude menor do dado simulado quando comparado com o traçado do dado experimental. Enquanto que o traçado entre o grupo experimento DM e simulado DM apresentam características semelhantes entre si. A figura 12 apresenta o traçado representativo desses grupos.

Figura 12: Comparação dos dados simulados com os experimentais do grupo Diabetes. Painel A - Traçado representativo da Inativação do grupo experimento CT - Simulado CT. Painel B - Experimento DM - Simulado DM.

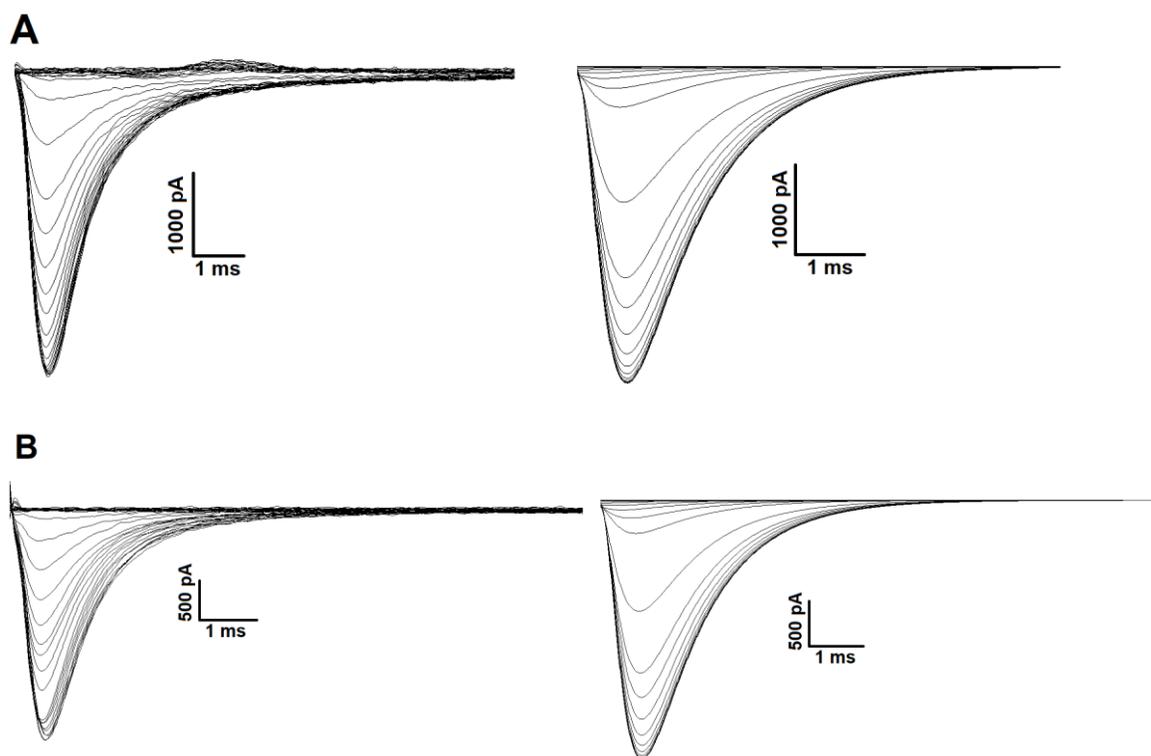
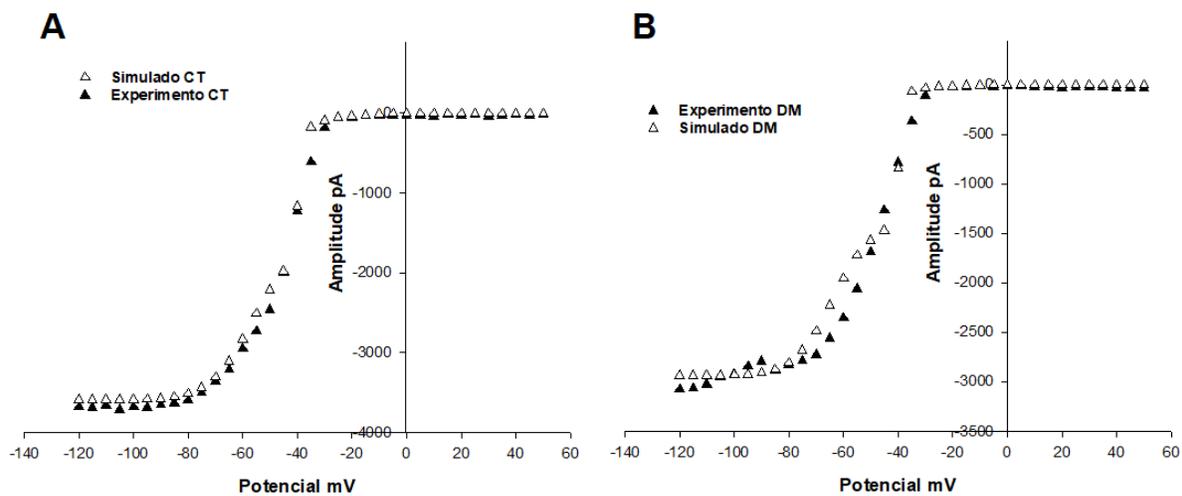


Figura 13: Relação I-V da inativação da corrente de Na⁺. Painel A - Experimental CT e Simulado CT; Painel B – Experimental DM e Simulado DM



7 DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que ocorreram três principais achados na pesquisa sendo eles: inicialmente o modelo de indução do DM mostrou-se eficaz e produziu hiperglicemia nos animais. O segundo aspecto é que, após análise dos dados obtidos, verificou-se que a indução do DM foi suficiente para produzir alterações nas correntes de Na⁺ dos neurônios do GCS. Houve assim uma diferença significativa quando avaliamos as curvas e traçados representativos dos grupos CT e DM de forma experimental. Por fim, o terceiro tópico que merece destaque foi que as equações utilizadas conseguiram realizar as simulações propostas inicialmente. Sendo assim, os traçados representativos e as curvas de ativação e inativação obtidas de forma simulada, apresentam boa similaridade quando comparada com os dados obtidos de maneira experimental.

Os modelos experimentais em animais são utilizados para estudar os aspectos relacionados a doenças. No caso, a administração de STZ tem sido uma forma eficiente de promover o DM nos animais (MAGALHÃES, *et al* 2019). A citação anterior pode ser explicada pelo fato de que a STZ é uma droga, com efeito, diabetogênico. Esta atua como agente citotóxico nas células β pancreáticas por meio do transportador de glicose 2 (GLUT2). A resposta final resulta na produção de DM, com marcante hiperglicemia, semelhante ao DM em humanos (LENZEN, 2008).

Em nosso estudo observamos que os modelos por indução química da DM representam freqüentemente similaridades à fisiopatologia esperada para o DM. Sendo a introdução da STZ mostrou-se como uma forma eficaz de promover a DM nos animais estudados. Após a indução da STZ os níveis da glicemia nos animais DM mantiveram-se superiores a 400 mg/dL, conseguindo assim a reprodução das condições de DM nesse grupo de animais.

O resultado obtido na indução da DM se assemelha aos estudos de Furman (2021) Silva-dos-Santos *et al.* (2020) e Silva-Alves *et al.* (2021) que conseguiram induzir o DM em níveis semelhantes aos encontrados em nosso estudo. Entretanto, Lee *et al.* (2022) ao utilizar a STZ na indução do DM conseguiram obter níveis de hiperglicemia que chegaram a 600 mg/dL. Ressalta-se que o valor observado no

estudo de Lee *et al.*, (2022) pode ser explicado devido o simples fato de que os animais utilizados por ele, apresentarem idade superior a 12 semanas que foi estipulado em nossa pesquisa.

Durante a avaliação da massa corporal dos animais utilizados, ressaltamos ainda que o grupo DM apresentou redução significativa da massa corpórea. Mudanças negativas na manutenção da massa corpórea de animais são comuns após a administração de STZ. Na pesquisa de Akinlode, Owoyele e Soladoye (2021), Yorek (2016) e de Sheikh *et al.* (2015) que após induzir o DM em ratos, verificaram que houve perda da massa corpórea de forma progressiva quando comparada a massa corpórea do grupo controle normal. O resultado acima corrobora com os dados vistos no presente estudo, em que os animais dos grupos DM mostraram-se hiperglicêmicos e com redução da massa corpórea nas primeiras semanas após indução de diabetes.

Yorek (2016) explica que a perda de massa corpórea constitui uma característica clara de que o animal apresenta DM, assim como ocorre em situações clínicas. O autor explica ainda que uma das formas de evitar a perda de massa corpórea é que os animais sejam apoiados por um regime de tratamento específico com por exemplo, o uso de agentes hipoglicemiantes. Assim, o controle da glicemia pode incluir como agente terapêutico doses de insulina e/ou medicações de via oral a fim de que possam manter os níveis glicêmicos equilibrados.

Sobre a avaliação das propriedades eletrofisiológicas da corrente de Na⁺ do GCS, de acordo com Karoly *et al* (2010), os canais de Na_v são as proteínas-chave no disparo do potencial de ação para a maioria das células excitáveis. Eles exibem um complexo comportamento de gating dependente do potencial de membrana. Outra característica relevante é que esses canais são capazes de inativação rápida (completa em poucos milissegundos) e diferentes formas de inativação lenta (constantes de tempo variando de 100 ms a vários minutos). Sendo assim, de acordo com o exposto anteriormente, protocolos especiais são usados para realizar avaliação dos dados eletrofisiológicos e análise do comportamento biofísico desses canais.

Gomes (2019) ressalta que quando um estímulo elétrico é aplicado na membrana neuronal de tal forma que seja suficiente para atingir o limiar, um PA é

disparado. A sua primeira fase, a despolarização, é provocada pelo aumento da permeabilidade da membrana ao sódio (aumento do g_{Na}), o que causa uma súbita abertura de canais de sódio dependentes de voltagem e permite que haja uma abundante entrada deste íon na célula (corrente para dentro). Esta, corrente, ao descarregar a capacitância da membrana, provoca nova série de despolarização, e, assim, abre ainda mais canais de sódio e aumenta ainda mais o influxo de sódio.

Os parâmetros eletrofisiológicos que foram avaliados em nossa pesquisa foram: as curvas de ativação e de inativação da corrente de Na^+ do GCS. Entre os principais parâmetros analisados estão: Pico I_{Na} (pA), $V_{1/2} - IV$ (mV), $K - IV$ (ms), E_{Na^+} (mV), G_{max} (nS), $V_{1/2} - G_{max}$ (nS), $K - G_{max}$ (ms), bem como a análise dos traçados representativos de cada grupo de neurônio. Thériaulte e Chanrine (2014) destacam que realizar a comparação dos transcritos do canal de Na^+ em neurônios individuais e os correlacionamos com os perfis eletrofisiológicos dos neurônios são fundamentais para avaliar o impacto dos parâmetros na excitabilidade celular.

O estudo de Estacion *et al* (2010) e Theodore *et al* (2004) ao realizarem a análise de dados eletrofisiológicos destacam que o primeiro passo para ajustar os dados I-V é obter o ponto médio de ativação. Assim é fundamental o auxílio de equações que possam realizar o ajuste médio da curva, um exemplo desta é a equação de Boltzman .

Chatelier *et al* (2008), também utilizou as correntes de pico que foram medidas e normalizadas para a resposta máxima de cada célula. Os dados de ativação e inativação foram ajustados com uma equação de Boltzman, onde $V_{1/2}$ e K representam, respectivamente, a metade da tensão máxima de ativação e inativação e o fator de inclinação: $I/I_{max} \exp[(V - V_{1/2})/K]$, e I_{max} representa a corrente máxima. Portanto a equação de Boltzman, tem se mostrado como uma boa ferramenta para realizar os ajustes dos parâmetros eletrofisiológicos.

Dyment *et al* (2020), ao realizar a caracterização eletrofisiológica das correntes Na^+ em neurônios, realizou os ajustes necessários para análise e, conseguiu obter diferenças significativas quando observadas a amplitude da corrente de pico e cinética de ativação. Sendo assim, os autores sugerem que os dados obtidos se devem a ocorrência de mudanças nas propriedades eletro-responsivas dos neurônios

que expressam o canal prejudicado.

O estudo de Yan-Li *et al* (2018) ao avaliar os efeitos da neuropatia periférica induzida em ratos, conseguiu identificar que houve um aumento da expressão e função dos Na_v 1.7 em neurônios do GRD. Já ao avaliar as relações médias de densidade da corrente e voltagem, estas se mostraram com amplitudes reduzidas que quando comparadas com as de grupo sem neuropatia. De acordo com Huang *et al* (2014) é comum que a expressão e a função de Na_v 1.7 estejam alterados sempre que avaliados modelos de caráter inflamatório como em câncer, diabetes ou ainda em dor neuropática, sendo que esse achado repercute diretamente em modificações dos parâmetros eletrofisiológicos da célula.

Estacion *et al* (2010), ao realizar a análise dos parâmetros eletrofisiológicos dos canais de Na^+ , também verificou parâmetros de ativação e inativação. Por meio dela obteve curva I-V de dos canais de Na^+ com boa definição, mas assim como nas citações, verificou na comparação que existem modificações dos correntes de Na^+ , dessa vez com redução das amplitudes para o grupo com diabetes.

Da mesma forma que observado nos estudos anteriores, a nossa pesquisa corrobora com os achados. Sendo assim os animais do grupo DM apresentam redução da amplitude de corrente de Na^+ quando comparadas com outros grupos, no nosso caso o grupo CT.

Observando um pouco sobre o mecanismo de inativação da Na^+ , entende-se que a inativação é a expressão que descreve a redução na condutância da membrana nos Na_v , a recuperação dessa inativação ocorre com a repolarização da membrana (ARMSTRONG, 2006). A cinética de desativação obtida em nosso estudo é semelhante aos achados do trabalho de Theodore *et al* (2004) e de Thériault e Chahine (2014). Sendo assim, a constante de tempo para inativação apresentou amplitude mais elevada no grupo CT quando comparada com o grupo DM. Nas células avaliadas, os canais de Na^+ foram inativados lentamente a 0 mV. Ou seja, alterações nas propriedades funcionais dos Na_v provavelmente contribuem na excitabilidade dos neurônios sensoriais espinhais e podem ser uma das bases que promovem sensações anormais de dor em pacientes.

Ferreira-da-Silva *et al* (2013) descreve em seu estudo que a modificação da

amplitude e dos parâmetros cinéticos das correntes de Na⁺ apresentaram alteração significativa entre os grupos analisados. Em modelo adulto de ratos com DM, entre outras alterações patológicas características do DM humano tipo I, é comum que ocorram modificações na velocidade de condução nervosa e downregulation nos Nav. O autor observou ainda que ocorreram alterações sensoriais e neurais significativas mesmo no grupo com alterações glicêmicas leves.

Brandão (2016) explica que o movimento observado no traçado de inativação é uma relação direta com a abertura dos canais de Na⁺. Sendo assim, como o sódio está em maior concentração do lado de fora que de dentro, os íons passam para dentro, com uma intensidade maior no começo, porém chega um momento em que os canais vão se fechando e esse fluxo começa a diminuir, tendendo a zero.

A inativação determina a disponibilidade do canal de sódio e, assim, contribui para a excitabilidade geral da membrana, determinando a propensão a gerar disparos repetitivos e a extensão da retropropagação do potencial de ação. A preferência pelo estado inativado lento foi proposta como uma vantagem terapêutica potencial em tipos específicos de epilepsia, dor neuropática (THEODORE *et al.* 2004). Assim Thériaulte e Chahine (2014) destacam que, os canais de Na⁺ contribuem para suas diferentes propriedades biofísicas sendo importantes para moldar as formas de onda do potencial de ação e a excitabilidade geral dos neurônios periféricos. Esclarecer as interações entre os subtipos de Nav's é um passo importante para entender o desenvolvimento da dor neuropática e a maturação e diversificação dos neurônios.

Com relação à simulação das correntes de Na⁺ do GCS, o modelo H-H estabeleceu as bases para o surgimento do conceito de canal iônico, até então inexistente, por constatar que as condutâncias associadas aos íons sódio e potássio eram variáveis e altamente dependentes da voltagem aplicada através da membrana neuronal. As condutividades para esses íons foram então descritas por um conjunto de equações diferenciais não-lineares capazes de prever com grande aproximação os valores medidos nos axônios gigantes de lula. Entretanto, evidências diretas da existência de canais iônicos só foram obtidas 34 anos mais tarde a partir da realização do experimento desenvolvido por Erwin Neher e Bert Sakmann (SEPULVEDA, 2017).

Segundo Correale (2017), a simulação de canais iônicos tem sido alvo de diversas pesquisas, e uma variedade de abordagens podem ser utilizadas, dependendo do poder computacional disponível, do grau de realismo que se busca e da necessidade de reproduzir resultados utilizando-se medidas laboratoriais. Na realidade a simulação de um modelo matemático não deve apenas ser tratada como um repetidor automático de resultados, mas sim como parte de um estudo que busca a compreensão mais profunda do fenômeno em que esta sendo estudado.

Sabemos que para realizarmos as simulações de excitabilidade celular as grandezas E , G_{max} , I e V , apresentam variações ao longo do tempo. A condutância ao íon sódio apresenta um processo de ativação dos canais, envolvendo partículas do tipo m e um outro de inativação, realizado pelas partículas h . De acordo com os estudos de Belluzzi e Sacchi (1991 e 1998), funções matemáticas contínuas estão disponíveis que descrevem as variáveis de ativação e inativação em função do tempo e da tensão.

Em nosso estudo, realizamos as simulações com base nas equações propostas por Belluzzi e Sacchi (1991 e 1998) e pudemos verificar que: as propriedades das correntes de Na^+ conseguiram ser reproduzidas com boa aproximação dos dados experimentais. Este achado é relevante e corrobora com os resultados do estudo de Magistretti *et al* (2006), que também ao realizar simulações computacionais de canais iônicos conseguiram reproduzir resultados com uma boa similaridade aos dados experimentais.

A pesquisa de Asfaw e Bondarenko (2019) ao utilizar o Modelo de Markov para reproduzir o canal de Na^+ humano do tipo $Na_v 1.1$ empregou três protocolos principais de fixação de voltagem: inativação em estado estacionário, desativação e recuperação da inativação. Esses protocolos são realizados a fim de permitir a determinação de todas as propriedades de gating do canal de sódio. Ressalta-se que a combinação da abordagem de protocolo de clamp de voltagem de várias etapas com estimulação estocástica melhorou significativamente o desempenho do método. No entanto, este modelo não conseguiu reproduzir as relações de inativação do estado estacionário, pois o potencial de semi-inativação simulado é muito mais despolarizado em comparação com o valor experimental.

Semelhante ao trabalho anterior, Rudy e Silva (2006) também estudaram os canais de sódio com base no modelo de Markov. Uma das vantagens do modelo de Markov é que ele é capaz de calcular a ocupação do canal em seus vários estados cinéticos em função da tensão e do tempo (e possivelmente de outros fatores, como a ligação do ligante). O canal conduz íons quando ocupa seu estado aberto (ou, em alguns casos, vários estados abertos). Ainda segundo os autores, dados de simulação utilizados no modelo de Markov se ajustam bem a quase todos os protocolos experimentais, mas não foi suficiente para obter o componente lento de recuperação da inativação, necessitam assim de melhorias para adequar os componentes.

Os pesquisadores ressaltam que os modelos celulares concentram-se em simular a atividade elétrica apenas sob condições de controle sendo que existem inúmeras vias regulatórias capazes de exercer efeito modulador na eletrofisiologia celular. Este efeito pode ser alcançado através da interação direta com outras proteínas ou íons dos canais iônicos, bem como as mutações de canais que, por sua vez, interagem e podem modificar processos eletrogênicos (BONDARENKO *et al* 2004; IYER, MAZHARI E WINSLOW, 2004; RUDY E SILVA, 2006).

De acordo com; Stiles e Gray (2021) sem a orientação de modelos matemáticos é impossível prever as respostas celulares à modificação de qualquer dos componentes celulares (por doença, drogas ou outras intervenções) ou para identificar o mecanismo subjacente com algum grau de certeza. É interessante ressaltar que mesmo diante das dificuldades citadas anteriormente, os modelos matemáticos tem sido cada vez mais importantes para realização de estudos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Demonstramos através desse estudo que o modelo de DM utilizado mostrou-se eficaz na indução do DM. Entre outros achados importantes o DM afetou diretamente os canais de Na_v do GCS. Ocorreu a modificação de parâmetros eletrofisiológicos como a redução de amplitude da corrente e da condutância máxima para o grupo DM quando comparado com o grupo CT.

Quanto ao modelo utilizado nas simulações dos canais de Na^+ , este descreveu com eficiência a reprodução dos dados encontrados de maneira experimental através do patch clamp. Sendo assim as simulações forneceram uma boa previsão para os achados de corrente de Na^+ .

Espera-se que os resultados dessa pesquisa possam contribuir de maneira direta na compreensão do comportamento dos canais de Na^+ , sobretudo em animais com DM. Sendo assim, o estudo cumpre com o objetivo proposto, podendo ainda ser utilizado como referência para a realização de outras pesquisas relacionadas à temática.

REFERENCIAS

- ABDI, H. The Method of Least Squares. 1In: Neil Salkind Ed. Encyclopedia of Measurement and Statistics. **Thousand Oaks** (CA): Sage, 2007.
- ARMSTRONG, G. M. Na channel inactivation from open and closed states. **Proc Natl. Acad. Sci. U. S.A.**, v. 103, n. 47, p.17991-17996, 2006
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**. 2019;42(Suppl 1):S1-193
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.36(1), p.567-574, 2013. <https://doi.org/10.2337/dc13-S067>
- AKINLADE , O . W.; OWOYELE, B. V.; SOLADOYE, A. O. Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes in rodents: a model for studying diabetic cardiac autonomic neuropathy. **African Health Sciences**, Vol 21 Issue 2, June, 2021.
DOI: [10.4314/ahs.v21i2.30](https://doi.org/10.4314/ahs.v21i2.30)
- ARULMOZHI, D. K.; VEERANJANEYULU, A.; BODHANKAR, S.L. Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: a glance. **Indian Journal of Pharmacology**, vol 36, nº 4, pág. 217-21, 2004;
- ASFAW, T. N.; BONDARENKO, V. E. Um Modelo Matemático do Canal de Na+ Cardíaco Humano. **The Journal of Membrane Biology**. 252:77–103. 2019.
- BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutrição**, v.22(1), p.113-24, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000100011>
- BRANDÃO, D. S. A aplicação da Dinâmica de Sistemas no funcionamento de neurônios. Trabalho de conclusão de curso de Licenciatura em Ciências Naturais. Faculdade UnB Planaltina. Planaltina - DF. 2016. Disponível em: https://bdm.unb.br/bitstream/10483/16743/1/2016_DavidDeSousaBrandao_tcc.pdf.
acesso em jan 2023
- BONDARENKO, V.E.; SZIGETI, G.P.; BETT, G. C.; KIM, S. J.; RASMUSSEN, R. L. Modelo computacional do potencial de ação de miócitos ventriculares de camundongos. **American Journal of Physiology–Heart and Circulatory Physiology**; 287:H1378–H1403. 2004.
- BRASILEIRO, A. D.; Efeitos da diabetes mellitus na densidade neuronal mioentérica e na expressão de canais de sódio no íleo de ratas. Dissertação (mestrado), PósGraduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba-MG, 2018. Disponível em: <http://bdtd.uftm.edu.br/bitstream/tede/602/5/Dissert%20Amanda%20D%20Brasileiro.p>

df. Acessoem jun. 2021

BERNE, R. M.; LEVY, N.M; STANTON, B. A.; KOEPPEN, B. M. **Fisiologia**. 5 ed., Elsevier, 1074 p. 2009.

BELLUZZI, O. SACCHI, O. A five-conductance model of the action potential in the rat sympathetic neurone. *Proo. Biophys. molec. Biol.*, Vol. 55, pp. 1-30, 1991

BEZZANILLA, F.; ARMSTRONG, C. M. Inactivation of the sodium channel: I. sodium current experiments. **Journal of General Physiology**, vol. 70, pág. 549-66, 1977.

CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Mechanisms of Neuropathic Pain. In: **Manuscript Neuron**. October 5; 52(1): 77–92. 2006.

CAMPANUCCI, V.;KRISHNASWAMY, A.; COOPER. E. Diabetes depresses synaptic transmission in sympathetic ganglia by inactivating nAChRs through a conserved intracellular cysteine residue. **J Neuron**. Jun 24;66(6):827-34. 2010. doi: 10.1016/j.neuron.2010.06.010.

CAMERON, N. E.; TUCK, Z.; MCCABE, L.; COTTER, M. A. Effects of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes. **Diabetologia**, v. 44, n. 9, p. 1161-1169, 2001.

CATERALL, W. A.; GOLDIN, A.L.; WAXMAN, S. G. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. **Pharmacol Rev**. Dec;57(4):397-409. 2005.

CHATELIER, A.; et al. Biophysical Properties of Human Nav1.7 Splice Variants and Their Regulation by Protein Kinase A. **J Neurophysiol**.VOL 99. MAY 2008.

CORREALE, T. G. A membrana e seus canais: um modelo computacional de neurônio. Tese (doutorado), Escola Plitecnica da Universidade de São Paulo. 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3139/tde-28062017-095334/publico/TiagoGuiglielmetiCorrealeCorr17.pdf>

DAS, V. **An introduction to pain pathways and pain “targets”**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., v. 131, 2015.

DYMENT, D. A. et al. Electrophysiological Alterations of Pyramidal Cells and Interneurons of the CA1 Region of the Hippocampus in a Novel Mouse Model of Dravet Syndrome. **Genetics**, Vol. 215, 1055–1066 August 2020.

DOWNS, C. A.; FAULKNER, M. S. Toxic stress, inflammation and symptomatology of chronic complications in diabetes. **World Journal of Diabetes**. v. 15, n. 4, p. 554-565, May, 2015.

ELINOS, D.; RODRÍGUEZ, R.; MARTÍNEZ, L. A.; ZETINA, M. E.; CIFUENTES, F.; MORALES, M. A. Segregation of Acetylcholine and GABA in the Rat Superior Cervical Ganglia: Functional Correlation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v.10, n.91, p. 1 – 12, 2018.

ESTACION, M. et al. Can robots patch-clamp as well as humans? Characterization of a novel sodium channel mutation. **J Physiol** 588.11. pp 1915–1927. 2010. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.186

FERREIRA-DA-SILVA, F. W.; SILVA-ALVES, K. S.; ALVES-FERNANDES, T. A.; COELHO-DE-SOUSA, A, N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Efeitos do 1,8-cineol nas correntes de Na⁺ de neurônios dos gânglios cervicais superiores dissociados. **Neuroscience letters**, 595. 45-49.2015.

FERREIRA-DA-SILVA, F. W. et al. n5-STZ Diabetic Model Develops Alterations in Sciatic Nerve and Dorsal Root Ganglia Neurons of Wistar Rats. **ISRN Endocrinology**. ID 638028, 13 pages. 2013.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Current Protocols**, 1, e78. 2021. doi: [10.1002/cpz1.78](https://doi.org/10.1002/cpz1.78)

GABBIANI, F. et al. **Mathematics for neuroscientists**. Amsterdam. Elsevier science, 2010.

GREGG, E. W.; SATTAR, N.; ALI, M. K. The changing face of diabetes complications. **Lancet Diabetes Endocrinol**. 4(6):537-47. 2016.

GONÇALVES, J. S.; GONÇALVES, A. L.; MIYAMOTO, S. A. impacto psico- social do *diabetes mellitus* tipo 1 sobre o indivíduo acometido. **Rev. Conexão Eletrônica**. Três Lagoas, MS. Volume 13. Número 1. Ano 2016.

GOMES, V. P. Fabricação de matrizes de microeletrodos semitransparentes através de escrita direta a laser. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Campinas, SP : [s.n.], 2019.

GOMES, A. A.; SARTOR, C. D.; SACCO, I. C.; BARNIK, M. M. Efeitos da intervenção fisioterapêutica nas respostas sensoriais e funcionais de diabéticos neuropatas. **Fisioterapia e pesquisa**; 14(1): 14-21. 2007.

HACKMANN, C. L. Modelos matemáticos para transporte de íons por canais de membranas de axônios. Dissertação (mestrado) programa de pos graduação e matematica aplicada. Universidade federal do rio grande do sul, porto alegre, 2007.

HONG, S.; MORROW, T. J.; PAULSON, P. E.; ISOM, L. L. AND WILEY, J. W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in

tetrodotoxinsensitive. and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. In: **The Journal of Biological Chemistry**, May 3, 2004.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes**. Sunderland: sinauer, 2001.

HODGKIN, A. L., HUXLEY, A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **Journal of Physiology**, vol. 117, pág. 500-544, 1952.

HUANG, Y. et al , O papel da via TNF-alfa/NK-kappa B na regulação positiva do canal de sódio dependente de voltagem $Na_v 1.7$ em neurônios DRG de ratos com neuropatia diabética . **Journal Neurochem Int** **75** : 112 – 119. 2014.
doi: 10.1016/j.neuint.2014.05.012

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 8th Edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

IYER, V.; MAZHARI, R.; WINSLOW, R. L. Um modelo computacional do epicárdio ventricular esquerdo humano miócito. **Biophysical Journal**; 87:1507–1525. 2004.

JIA, Z. et al. Genistein inhibits voltage-gated sodium currents in SCG neurons through protein tyrosine kinase-dependent and kinase-independent mechanisms. **Pflugers Arch - Eur J Physiol**. 456:857-866. 2008.

KARMAZINOVA M & LACINOVA L. Measurement of cellular excitability by whole cell patch clamp technique. **Physiol. Res.** 59 (Suppl. 1), S1-S7. 2010.

KAROLY, R.; et al. Mecanismos inibidores do canal de Na^+ . **Journal PLoS Biology Computacional**. Volume 6, Edição 6, e1000818. Volume 6. Edição 6. e1000818 Junho de 2010.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Fundamentos da neurociência e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 97-131. 2000.

LIMA, T. C. Hiperglicemia induz hiperalgesia mecânica e despolarização do potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos primários: papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2018. Disponível em:
<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/22723/1/hiperglicemiainduzhiperalgesia.pdf>. acesso em jun. 2021.

LEE, Y. K. et al. Single-agent FOXO1 inhibition normalizes glycemia and induces gut β -like cells in streptozotocin-diabetic mice. **Molecular Metabolism**. V. 66, 101618. December 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101618>

LIU, M.; WOOD, J.N. The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of neuropathic pain. **Pain Med.** 12(Suppl3):S93-9. 2011.

LUO, S. et al. Pulpitis increases the proportion of atypical nodes of Ranvier in human dental pulp axons without a change in Nav1.6 sodium channel expression. **Neuroscience**, v. 169, n. 4, p. 1881–1887, 2010.

LI, C.; HORN, J. Physiological Classification of Sympathetic Neurons in the Rat Superior Cervical Ganglion. **J Neurophysiol.** 95: 187–195, 2006.

LENZEN, S. 'The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes', **Diabetologia journal**, 51(2), pp. 216–226. 2008. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7.

MACEDO, F. H. Elevação da concentração plasmática de tnf pelo diabetes mellitus altera atividade de canais de sódio dependentes de voltagem, efeito atenuado pelo tratamento com o composto A. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2017.

MAGALHÃES, D. A. D. et al. High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 91, n. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, 2019.

MAGISTRETTI, J.; CASTELLI, L.; FORTI, L.; D'ANGELO, E. Análise cinética e funcional das correntes transientes, persistentes e ressurgentes de sódio em células granulares cerebelares de ratos in situ : um estudo eletrofisiológico e de modelagem . *J Physiol*573.1. páginas 83–106. 2006.

MARTINELLO, M. Avaliação e elaboração de um plano de tratamento fisioterapêutico em paciente com neuropatia diabética: um estudo de caso. <http://www.efdeportes.com/> **Revista Digital** - Buenos Aires - Año 14 - N° 141 - Febrero de 2010

MOREIRA-JÚNIOR, L Estudo das alterações eletrofisiológicas dos neurônios do gânglio cervical superior de ratos pré diabéticos. (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas.) — Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde. Fortaleza, 60 p. 2010.

NETTER - **Atlas de anatomia da cabeça e pescoço** / Neil S. Norton ; ilustração Frank H. Netter, Carlos Machado ; [tradução Alcir C. Fernandes Filho, Paulo Laino Cândido...[et al.]] - 3. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 712 p. : il. ; 23 cm. 2018.

NEVES, G. F. Análise teórica dos efeitos de campo eletromagnético de 60Hz na atividade elétrica de células B-pancreáticas. *Disertação (Mestrado), pós-graduação em Biociências Animal. Universidade Rural Federal de Pernambuco. Recife, 2013.*

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed, ed. 6; 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS, **Diabetes mellitus**. Disponível em http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/. Acesso em: fev 2023.

PEDROSA, H. C. Capítulo 02 – Neuropatia diabética periférica, 2014. Disponível em: < <http://www.diabetes.org.br/ebook/component/k2/item/39-neuropatia-diabeticaperiferica> >. Acesso em: 10 de mai. 2021.

POP-BUSUI, R.; BOULTON, A.J.M.; FELDMAN, E.L.; BRIL, V.; FREEMAN, R.; MALIK, R.A.; SOSENKO, J.M.; ZIEGLER, D. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by The American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 40(1), p. 136-154, 2017. <https://doi.org/10.2337/dc16-2042>

PROKS, P.; ASHCROFT, F. M. Modeling KATP channel gating and its regulation. **Review Biophysics and Molecular Biology**, v.99, p 7-19, 2009.

QUINAUD, J. T. Modelo matemático eletrodifusivo da propagação de um potencial de ação no axônio de uma célula neuronal (tese)- Doutorado em engenharia química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2016.

RAIOL, P. A.; CÂMARA, P. C.; RAIOL, R. A. Os benefícios do treinamento resistido no controle da diabetes mellitus tipo 2. **EFDeportes.com**, Revista Digital. Buenos Aires, Año 16, Nº 165, Febrero de 2012.

ROQUE, A, Biofísica dos Canais iônicos. **J. Physiol.** 117:500-544. 2020. Disponível em: <http://sisne.org/Disciplinas/Grad/Biofisica2FisMed/Canais%20i%C3%B4nicos.pdf>. Acesso em jun. 2021

ROUX, B. Ion channels and ion selectivity. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 201–209, 2017.

RUDY, Y.; SILVA, J. R. Biologia computacional no estudo de canais iônicos cardíacos e eletrofisiologia celular. **Rev Biophys.** 39(1): 57–116. fevereiro de 2006.

SANTOS, A. A. Efeito do treinamento proprioceptivo em mulheres diabéticas. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 12, n. 3, p. 183-7, mai./jun. 2008.

SAVASTANO, L. E. et al. A standardized surgical technique for rat superior cervical ganglionectomy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 192, n. 1, p. 22–33, 2010.

SACCHI, O., BELLUZZI, O., CANELLA, R., FESCE, R. A model of signal processing at a mammalian sympathetic neurone. **Journal of Neuroscience Methods** 80, 171–180., 1998.

SEMRA, Y.K.; SMITH, N.C.E.; LINCOLN, J. Comparative effects of high glucose on different adult sympathetic neurons in culture. **Neuroreport**, v. 15, n. 15, p. 2321-2325, 2004.

SILVA-DOS-SANTOS, N. et al. Diabetes mellitus alters electrophysiological properties in neurons of superior cervical ganglion of rats. **Brain Research**. v. 1729, p. 1-28. iFebruary 2020.

STILES, P. J.; GRAY, C. G. Modelo de tipo Hodgkin-Huxley aprimorado para potenciais de ação neural. **European Biophysics Journal**. 50:819–828. 2021.

SILVA-ALVES, K. S. et al. Essential Oil of Croton zehntneri Prevents Conduction. **Plants**, 10, 893. 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10050893>.

SILVA-DOS-SANTOS, N. M; et al. Diabetes mellitus alters electrophysiological properties in neurons of superior cervical ganglion of rats. **Brain Research**, [S.l.:s.n.], 2020.

SHEIKH, B. A; PARI, L; RATHINAM, A; CHANDRAMOHAN, R. Trans-anethole, a terpenoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. **Biochimie**, [S.I.], v.112, p.57-65, 2015.

SEPULVEDA, A. F. Modelo de Hodgkin-Huxley resolvido pelo método de Runge-Kutta. C.Q.D.– **Revista Eletrônica Paulista de Matemática**, Bauru, v. 11, p. 107-122, dez. 2017. Edição Iniciação Científica. DOI: 10.21167/cqdv011ic201723169664afs107122 Disponível em: <http://www.fc.unesp.br/#!/departamentos/matematica/revista-cqd/>

SUNDT, D., GAMPER, N., JAFFE, D.B. Spike propagation through the dorsal root ganglia in an unmyelinated sensory neuron: a modeling study. **J Neurophysiol**. 1; 114(6): 3140 –3153, 2015.

SESSLE, B.J. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. **Int Rev Neurobiol.**, v. 97, p. 179 -206. 2011.

SCHRENK-SIEMENS, k.; RÖSSELER, C.; LAMPERT, A. Translational Model Systems for Complex Sodium Channel Pathophysiology in Pain. **HandbExpPharmacol**. 246:355-369. 2018.

TESFAYE, S.; BOULTON, A. J.; DICKENSON, A. H. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. **Diabetes Care**. v. 36, n. 9, p. 2456- 2465, Sep. 2013.

THÉRIAULTE, O.; CHAHINE, M. Correlation of the electrophysiological profiles and

sodium channel transcripts of individual rat dorsal root ganglia neurons. **Ront. Cell. Neurosci.** V. 8. 19 September 2014.

THEODORE, R. et al. Propriedades eletrofisiológicas dos canais de sódio mutantes Nav1.7 em uma neuropatia hereditária dolorosa. **The Journal of Neuroscience**, 24(38):8232–8236. 22 de setembro de 2004.

YOKOTA, H.; MUKAI, H.; HATTORI, S.; YAMADA, K.; ANZAI, Y.; UNO, T. Imaging of the Superior Cervical Ganglion and Inferior Ganglion of the Vagus Nerve: Structures That Can Mimic Pathologic Retropharyngeal Lymph Nodes. **American Journal of Neuroradiology**. v.39, n.1, p. 170 – 176, 2018.

YPREY, D. L.; DEFELICE, L. J. The patch-clamp technique explained and exercised with the use of simple electrical equivalent circuits. *Electrical Properties of Cells*; Springer: Boston, MA, USA, 7. 2000.

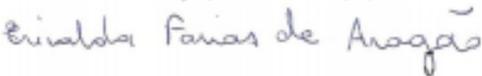
YAN-LI, R. et al. DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 é regulado positivamente na neuropatia induzida por paclitaxel em ratos e em humanos com dor neuropática. *Journal of Neuroscience*. 38 (5) 1124-1136. 31 de janeiro de 2018.

YOREK, M. A. Chapter Six - Alternatives to the Streptozotocin-Diabetic Rodent. **International Review of Neurobiology**. V. 127. Pages 89-112. 2016.
<https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.03.002>

WEI, M., ONG, L., SMITH, M.T., ROSS, F.B., SCHIMD, K., HOEY, A.J., BURSTOW, D., BROWN, L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. **Heart, Lung and Circulation**, vol. 12, pág. 44-50, 2003.

WEI, Q. et al. Pathological Mechanisms in diabetes of the exocrine pancreas: What's Known and What's to Know. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 1394, 2020

ANEXO A - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS - CEUA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARA - UECE

 <p>UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ</p>	<p>Comissão de Ética para o Uso de Animais Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi CEP 60740-903 – fone 3101-9890 ceua.uece@uece.br – www.uece.br/ceua</p>	 <p>GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ <small>Serviço À Ciência, Tecnologia e Educação Superior</small></p>
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que o Projeto intitulado “Investigação das alterações na excitabilidade neuronal promovidas pelo Diabetes Mellito experimental devido a mudanças na expressão e/ou função de canais iônicos utilizando simulação computacional” registrado sob o número 080921131/2020, tendo como pesquisador principal Francisco Walber Ferreira da Silva está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 31 de dezembro de 2023.</p>		
CERTIFICATE		
<p>We hereby certify that the Project entitled “Investigação das alterações na excitabilidade neuronal promovidas pelo Diabetes Mellito experimental devido a mudanças na expressão e/ou função de canais iônicos utilizando simulação computacional” registered with the protocol 080921131/2020, under the supervision of Francisco Walber Ferreira da Silva is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire on December 31st, 2023.</p>		
RESUMO		
Vigência do projeto	Janeiro/2021 a Janeiro/2023	
Espécie/linhagem	<i>Ratus norvegicus</i> Wistar	
Número de animais	40	
Peso/idade	150-250g/2 meses	
Sexo	Ambos os sexos	
Origem	Biotério da Universidade Estadual do Ceará	
Fortaleza, 28 de maio de 2020.		
		
<p>Maria Erivalda Farias de Aragão Presidente CEUA-UECE</p>		

APÊNDICE A – PROGRAMA DE LINGUAGEM EM C UTILIZADO NAS SIMULAÇÕES

```

/* Este programa calcula das correntes de Na+ do gânglio cervical superior de ratos
com base no artigo de Belluzi e Sacchi 1998 */

#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <math.h>

int i, j;
float Ina, gna, V, Ena, m, h, dmdt, dhdt, Tm, Tm_inat, Th, Th_inat, dt, dv, t, Q10, TC, V_com;
floatdados_ina[36][10001], m_ina[36][10001], h_ina[36][10001];

//cálculo do m
floatm_inf(float V)
{
floatm_inf;
m_inf=1/(1+exp((-29.0-V)/6.35)); //valor do artigo para  $V_{1/2} = -36.0$ ;  $k = 7.2$ 
returnm_inf;
}

// cálculo do h
float h_inf (float V)
{
floath_inf;
h_inf=1/(1+exp((V+48.2)/6.5)); // valor do artigo para  $V_{1/2} = 53.2$ ;  $k = 6.5$ 
return h_inf;
}

int main ()
{
FILE *arq;
arq=fopen("corrente_na.txt", "w");
FILE *arq2;
arq2=fopen("m_ina.txt", "w");
FILE *arq3;
arq3=fopen("h_ina.txt", "w");
FILE *arq4;
arq4=fopen("taus_m-h.txt", "w");

//gna= 9.28; //valor do artigo 9.28 microS
gna= 0.9; //valor do artigo 9.28 microS
dt= 0.01;
dv= 5.0;
Ena= +40.0; //valor do artigo + 40.0 mV
V =-120.0;
V_com=-120.0;

```

```

/* cálculo do fator relacionado à temperatura */
TC=24.0; //temperatura em °Celsius. Modificar a temperatura aqui.
Q10=pow(3,((TC - 37.0)/10.0));
printf ("Temperatura = %.1f\n", TC);
printf("valor do Q10 = %.3f\n", Q10);
/* cálculo do fator relacionado à temperatura */
fprintf(arq4, "\tm\tth\n");
for(i=0;i<=35; i++)
{
    t=0.0;
    m=m_inf(-120.0);
    h=h_inf(-120.0);
    j=0;
    while (j<=10000)
    {
        if (j<8000)
        {
            V=V_com;
            Tm=(1/Q10)*(0.06+1/(42.98-exp(0.08915*V)+0.9230*exp(-
0.03351*V)));
            Th = (1/Q10)*((-0.0046*V+0.26)+50.85/((1 + exp((-59.46-V)/7.91
)))+(1 + exp((V+ 40.94)/1.556))););
            Ina = Q10*(gna*(V-Ena)*pow(m,3)*h);
            dados_ina[i][j]=Ina;
            dmdt= (m_inf(V)-m)/Tm;
            dhdt= (h_inf(V)-h)/Th;
            m=m+(dmdt*dt);
            m_ina[i][j]=m;
            h=h+(dhdt*dt);
            h_ina[i][j]=h;
        }
        if (j>=8000 && j<=10000)
        {
            V = 0.0;
            Tm=(1/Q10)*(0.06+1/(42.98-exp(0.08915*V)+0.9230*exp(-
0.03351*V)));
            Th = (1/Q10)*((-0.0046*V+0.26)+50.85/((1 + exp((-59.46-V)/7.91
)))+(1 + exp((V+ 40.94)/1.556))););
            Ina = Q10*(gna*(V-Ena)*pow(m,3)*h);
            dados_ina[i][j]=Ina;
            dmdt= (m_inf(V)-m)/Tm;
            dhdt= (h_inf(V)-h)/Th;
            m=m+(dmdt*dt);
            m_ina[i][j]=m;
            h=h+(dhdt*dt);
            h_ina[i][j]=h;
        }
    }
    t=t+dt;
    j++;
}

```

```
        V_com=V_com+dv;
    }

    t=0.0;
    for (j=0; j<=10000; j++)
    {
        fprintf (arq, "%f\t", t);
        fprintf (arq2, "%f\t", t);
        fprintf (arq3, "%f\t", t);
        for (i=0;i<35; i++)
        {
            fprintf(arq, "%.4f\t", dados_ina[i][j]);
            fprintf(arq2, "%.4f\t", m_ina[i][j]);
            fprintf(arq3, "%.4f\t", h_ina[i][j]);
        }
        fprintf(arq, "\n");
        fprintf(arq2, "\n");
        fprintf(arq3, "\n");
        t=t+0.01;
    }

    fclose(arq);
    fclose(arq2);
    fclose(arq3);
    fclose(arq4);
    return (0);
}
```