

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA

**VITAMINA D ATENUA NOCICEPÇÃO E MODIFICA PARÂMETROS DE  
ESTRESSE OXIDATIVO EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR  
NEUROPÁTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIA DO CARMO QUEVEDO SANTOS

PORTO ALEGRE, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**VITAMINA D ATENUA NOCICEPÇÃO E MODIFICA PARÂMETROS DE  
ESTRESSE OXIDATIVO EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR  
NEUROPÁTICA**

Maria do Carmo Quevedo Santos

Orientadora: Prof. Dra. Wania Aparecida Partata

Dissertação apresentada ao programa de Pós-  
graduação em Ciências Biológicas:  
Fisiologia, da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisito parcial para a  
obtenção do título de mestre em Fisiologia

PORTO ALEGRE, 2020

**MARIA DO CARMO QUEVEDO SANTOS**

**VITAMINA D ATENUA NOCICEPÇÃO E MODIFICA PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia

**Orientadora: Prof. Dra. Wania A. Partata**

**Banca Examinadora:** DR. Luciano Sturmer de Fraga – UFRGS

DRA. Ana Maria O. Battastini - UFRGS

DR. Alex Sander da Rosa Araújo - UFRGS (RELATOR)

---

*Dedico este trabalho à minha mãe que sempre me incentivou a busca pelo conhecimento e aos mestres que me passam esse conhecimento.*

---

## AGRADECIMENTOS

À profa. Wania Partata, pela melhor orientação que eu poderia receber. Não apenas foi uma orientadora com muita didática para transmitir seu conhecimento teórico e prático, mas também foi uma parceira com muita paciência e dedicação para orientar suas diferentes alunas. Eu sou grata por todo seu empenho e esforço que foram além do que tange ao laboratório;

Aos meus colegas que me acompanharam neste trabalho no Laboratório de Neurobiologia Comparada: Clivia, Adarly, Elza, Thaisla e Fran. Essa parceria rendeu não apenas crescimento profissional com discussões acerca de artigos científicos, apresentações prévias de seminários, suportes para a qualificação e auxílio nos experimentos, mas também rendeu saídas para comermos juntas, dancinhas no período de incubação e piadas científicas. Vocês são incríveis!

À profa. Denise Zancan e à profa. Renata Rosat, pelo auxílio nessa busca por conhecimento e parceria no laboratório;

À Dona Ritinha, pelos “quitudes” que muitas vezes deram energia para a realização dos experimentos;

Aos professores do PPG Fisiologia, por toda a didática e esforço em transmitir seus conhecimentos para nós, alunos;

Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar este trabalho;

Ao Laboratório de Parasitologia, principalmente à técnica Clarissa, pela dedicação em me receber no laboratório e emprestar equipamentos para realização de experimentos;

À Profa. Angela T. Wyse, pelo ensinamento na diluição da vitamina D;

À secretaria do PPG Fisiologia, pelo suporte e esclarecimentos de dúvidas;

À Capes, pela bolsa concedida;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela oportunidade em me receber como aluna;

Aos meus amigos da graduação, Karoline e Eduardo, pelas conversas e desabafos quando os experimentos não davam certo ou surgia um desespero frente a ameaça do corte das bolsas de pós-graduação;

Às minhas amigas do ensino médio, Debora, Laís e Denise. Por mais que nossas rotinas não nos permitem mais passarmos tanto tempo juntas quanto gostaríamos, eu sempre vou ter um carinho enorme por vocês e cultivar nossa amizade.

Ao curso popular ONGEP, o qual oferece aulas voluntárias que me possibilitaram o ingresso na UFRGS e, assim, todas as conquistas posteriores que obtive graças a esse suporte. A Universidade deve ser de todos!

À família Maciel, principalmente à Simone e Luiz Augusto. Vocês me receberam como parte da família e eu tive uma sorte grande de tê-los conhecidos. Obrigada por todo o companheirismo, conselhos e suporte na minha vida.

Ao Samuel, por ser carinhoso, dedicado e entender os períodos de ausência. Você é uma pessoa incrível e boa parte desse trabalho aconteceu porque você me incentivou na pesquisa.

Aos meus pais, principalmente minha mãe que infelizmente não está mais presente. Obrigada pelo incentivo, pelos conselhos, por todo o empenho em fazer a filha de vocês ter acesso a educação a qual vocês não tiveram. Essa conquista pode ser minha, mas a vitória é de todos nós!

A todos que passaram pela minha vida e me incentivaram na trajetória do mestrado.

---

## RESUMO

**Título:** VITAMINA D ATENUA NOCICEPÇÃO E MODIFICA PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA

**Autora:** MARIA DO CARMO QUEVEDO SANTOS

**Orientadora:** WANIA APARECIDA PARTATA

Atualmente, muitos estudos indicam um papel benéfico de compostos com ação antioxidante no manejo da dor neuropática, a dor devido à lesão no tecido nervoso. A vitamina D possui papel importante na regulação de antioxidantes endógenos. Essa vitamina também parece desempenhar papel importante na dor, pois sua deficiência está associada a condições dolorosas. Todavia, desconhece-se a relação entre analgesia induzida por vitamina D e marcadores de estresse oxidativo no tecido nervoso em condição de dor. Assim, este estudo avaliou os efeitos temporais da administração oral de vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>), a forma ativa da vitamina D, sobre limiar mecânico e térmico, como medidas nociceptivas; índice funcional do nervo isquiático (IFI), como indicador de recuperação funcional desse nervo; e parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático lesionado e segmento lombossacral da medula espinal em ratos adultos com constrição crônica no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), um modelo de dor neuropática amplamente usado na literatura. A administração da vitamina foi por *gavage*, na dose de 500 unidades internacionais/kg/dia durante 7 e 28 dias, tendo início 24 h após a CCI. Como veículo foi usado azeite de oliva. A Vit. D<sub>3</sub> atenuou a redução nos limiares mecânico e térmico e IFI, os quais foram diminuídos pela CCI. Paralelamente, a Vit. D<sub>3</sub> preveniu o acréscimo significativo na concentração de hidroperóxidos lipídicos em nervo isquiático lesionado, o qual foi induzido pela CCI. Nesse nervo não foram observadas alterações estatisticamente significativas na capacidade antioxidante total (TAC, do inglês *total antioxidant capacity*), independente do tratamento recebido pelo rato CCI. Na medula espinal, a Vit. D<sub>3</sub> não preveniu o aumento significativo na geração de ânion superóxido (SAG, do inglês *superoxide anion generation*) e nos valores de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induzidos pela CCI somente aos 7 dias após a lesão. Aos 7 dias houve correlação negativa significativa entre valores de limiar mecânico e SAG e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A Vit. D<sub>3</sub> foi capaz de prevenir o acréscimo nos valores de hidroperóxidos lipídicos em medula espinal, mas ela aumentou significativamente a TAC nesse tecido aos 28 dias, esse último efeito observado apenas quando se compararam os valores àqueles obtidos em ratos CCI tratados com veículo por igual período. A vitamina preveniu a queda no conteúdo de tióis totais da medula espinal, tanto aos 7 quanto aos 28 dias. Nos ratos do estudo, não foram encontradas alterações significativas no peso corporal, e nos indicadores de função hepática, como bilirrubina direta, aspartato amino transferase e alanina amino transferase, e de função renal, como creatinina. Assim, os resultados do presente estudo reforçam o efeito antinociceptivo da vitamina D e mostram, pela primeira vez, que alterações em parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal contribuem para esse efeito dessa vitamina.

**Palavras-chave:** Limiar mecânico, limiar térmico, índice funcional do nervo isquiático, geração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, tióis totais.

---

## ABSTRACT

**Title:** VITAMIN D ATTENUATES NOCICEPTION AND MODULATES OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN SPINAL CORD OF RATS WITH NEUROPATHIC PAIN

**Author:** MARIA DO CARMO QUEVEDO SANTOS

**Advisor:** WANIA APARECIDA PARTATA

Currently, many studies indicate a beneficial role for compounds with antioxidant action in the management of neuropathic pain, which is caused by damage to nervous tissue. Vitamin D plays an important role in the regulation of endogenous antioxidants. This vitamin also appears to play an important role in pain, since its deficiency is associated with painful conditions. However, the relationship between vitamin D-induced analgesia and markers of oxidative stress in nerve tissue during pain is unknown. Thus, this study evaluated the temporal effects of oral administration of vitamin D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>), the active form of vitamin D, on mechanical and thermal thresholds, as nociceptive measurements; sciatic functional index of sciatic nerve (SFI), as an indicator of functional recovery of this nerve; and oxidative stress parameters in injured sciatic nerve and lumbosacral spinal cord in adult rats with chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve, a model of neuropathic pain widely used in the literature. Vitamin D was administered by gavage, at a dose of 500 international units/kg/day for 7 and 28 days, starting 24 h after the CCI. Olive oil was used as vehicle. Vit. D<sub>3</sub> attenuated the reduction in mechanical and thermal thresholds and IFI caused by the CCI. At the same time, Vit. D<sub>3</sub> prevented the significant increase in lipid hydroperoxides levels in injured sciatic nerve induced by the CCI. There were no statistically significant changes in the total antioxidant capacity (TAC) in this nerve, regardless of the treatment received by the animal that underwent the CCI. In spinal cord, Vit. D<sub>3</sub> did not prevent the significant increase in superoxide anion generation (SAG) and in the values of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced by CCI only at 7 days after the injury. At 7 days, there was a significant negative correlation between mechanical threshold values and SAG and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vit. D<sub>3</sub> was able to prevent the increase of lipid hydroperoxides levels in the spinal cord, but it significantly increased TAC in this tissue at 28 days, the latter effect observed only when comparing the values obtained in CCI rats treated with vehicle for the same period. The vitamin prevented the drop in the total thiol content of the spinal cord, both at 7 and 28 days. No significant changes were found in body weight and liver function indicators of the animals, such as direct bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and renal function, such as creatinine. Thus, the results of the present study reinforce the antinociceptive effect of vitamin D and demonstrate for the first time that changes in oxidative stress parameters in the spinal cord contribute to the effect of vitamin D.

**Keywords:** Mechanical threshold, thermal threshold, sciatic functional index, superoxide anion generation, hydrogen peroxide, total thiols.

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinal lombar, ilustrando a formação do nervo isquiático .....19
- Figura 2: Redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) até a formação de água ( $H_2O$ ) pela ação de enzimas NADPH oxidases ( $NO_x$ ) e da fosforilação oxidativa (FOx).....21
- Figura 3: Esquema mostrando os grupos experimentais e os tratamentos usados na pesquisa.....27
- Figura 4: As fotografias mostram a sequência dos procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos.....28
- Figura 5: Esquema mostrando o teste de von Frey eletrônico, onde se nota o aparelho de von Frey (A), a ponteira usada para aplicar força à região plantar da pata direita de um rato com CCI (C)..... 30
- Figura 6: Esquema mostrando o aparelho usado no teste da placa quente.....31
- Figura 7: Fotografia do aparato usado no teste de marcação das patas.....32
- FIGURA 8: Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Isquiático (IFI).....33
- Figura 9 – Esquema temporal mostrando os dias das avaliações das sensibilidades mecânica (LM) e térmica (LT), do índice funcional do nervo isquiático (IFI), da realização do procedimento cirúrgico, morte, e dias de administração de vitamina  $D_3$ , por *gavage*, na dose de 500 UI/kg/dia.....34
- Figura 10: Medida do limiar mecânico em ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina  $D_3$  (Vit.  $D_3$ ) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....40
- Figura 11: Medida da latência de retirada da pata (limiar térmico) em ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina  $D_3$  (Vit.  $D_3$ ) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....41
- Figura 12: Índice funcional do isquiático em ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina  $D_3$  (Vit.  $D_3$ ) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....42

Figura 13: Valores de hidroperóxidos lipídicos em nervo isquiático lesionado de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....43

Figura 14: Valores de hidroperóxidos lipídicos em segmento lombossacral da medula espinal de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....44

Figura 15: Geração de ânion superóxido (SAG) em segmento lombossacral da medula espinal de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....45

Figura 16: Valores de peróxido de hidrogênio em segmento lombossacral da medula espinal de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....46

Figura 17: Capacidade antioxidante total (TAC) em nervo isquiático lesionado de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....47

Figura 18: Capacidade antioxidante total (TAC) em segmento lombossacral da medula espinal (de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....48

Figura 19: Valores de tióis totais em segmento lombossacral da medula espinal de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia.....49

Figura 20. Peso corporal de ratos que receberam vitamina D<sub>3</sub> (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 28 dias após constrição crônica no nervo isquiático direito (CCI).....51

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Efeito da administração oral de vitamina D <sub>3</sub> (Vit. D <sub>3</sub> ) por 28 dias sobre parâmetros plasmáticos em ratos sem qualquer manipulação cirúrgica.....	50
---	----

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS<sup>•+</sup> – 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato)
- ALT – alanina aminotransferase
- AST – aspartatoaminotransferase
- ANOVA – análise de variância
- BHT – butil-hidroxitolueno
- CAT – enzima catalase
- CCI – constrição no nervo isquiático (do inglês, *chronicconstrictioninjury*)
- CREAL – centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório
- DTNB – ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico)
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- FOx – fosforilação oxidativa
- GABA – ácido gama-aminobutírico
- GPx – glutationaperoxidase
- GSH – glutationa na sua forma reduzida
- H<sub>2</sub>O – água
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio
- IASP – *International Association for the Study of Pain*
- IFI – índice funcional do isquiático
- KCl – cloreto de potássio
- MEOH – metanol absoluto
- NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NBT – azul de nitrotetrazol
- NOx – NADPH oxidases
- O<sub>2</sub> – oxigênio molecular
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – ânion superóxido
- OH<sup>•</sup> – radical hidroxil
- PBS – tampão fosfato-salina
- PMSF – fenil-metil-sulfonil fluoreto
- ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactiveoxygenspecies*)
- SAG – geração de ânion superóxido
- SNC – sistema nervoso central

SOD – enzima superóxido dismutase

TAC – capacidade antioxidante total

Vit. D – vitamina D

Vit. D<sub>2</sub> – vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol)

Vit. D<sub>3</sub> – vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol)

XO – xilenol laranja

---

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	5
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELA.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
SUMÁRIO.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Dor e nocicepção .....	16
1.2 Uso de modelos animais no estudo da dor neuropática.....	18
1.3 Espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes: alterações na dor neuropática.....	20
1.4 Potencial efeito antinociceptivo e antioxidante da vitamina D .....	22
2. HIPÓTESE .....	24
3. OBJETIVOS .....	25
3.1 Objetivo geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Animais: procedência e manutenção .....	26
4.2 Delineamento experimental .....	26
4.3 Constrição no nervo isquiático .....	27
4.4 Administração de veículo e vitamina D .....	29
4.5 Parâmetros nociceptivos .....	30
4.5.1 Determinação do limiar mecânico .....	30
4.5.2 Determinação do limiar térmico .....	31
4.6 Determinação do índice funcional do isquiático (IFI).....	32
4.7 Preparo das amostras.....	34
4.8 Parâmetros de estresse oxidativo .....	35
4.8.1 Formação de ânion Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	35
4.8.2 Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ).....	35
4.8.3 Hidroperóxidos lipídicos .....	36
4.8.4 Capacidade antioxidante total.....	36
4.8.5 Tióis totais .....	37
4.9 Indicadores de função hepática e renal.....	37

4.10	Determinação do peso corporal .....	37
4.11	Análise estatística .....	37
4.12	Disposição final dos resíduos da pesquisa.....	38
4.12.1	Resíduos químicos .....	38
4.12.2	Resíduos biológicos .....	38
5.	RESULTADOS .....	39
5.1	Parâmetros nociceptivos .....	39
5.1.1	Limiar mecânico.....	39
5.2.2	Limiar térmico.....	41
5.2	Índice funcional do nervo isquiático (IFI).....	42
5.3	Parâmetros de estresse oxidativo .....	43
5.3.1	Pró-oxidante.....	43
5.3.2	Antioxidante.....	47
5.4	Indicadores de função hepática e renal.....	50
5.5	Peso corporal .....	51
6.	DISCUSSÃO .....	52
7.	CONCLUSÃO.....	59
8.	PERSPECTIVAS .....	60
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
	ANEXO I.....	70

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é uma sensação desagradável, constituindo um dos componentes essenciais do sistema de defesa do organismo (FEIN, 2011). De acordo com a definição dada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, *International Association for the Study of Pain*), a dor é uma experiência sensorial desagradável associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugerem tal dano. Nesse sentido, a dor pode se referir a sensações como irritação, ardência, inflamação ou latejar, geralmente sensações que são provenientes de alguma parte do corpo e constituem uma sensação de caráter subjetivo (THOMPSON et al., 2017; CAREY & AS-SANIE, 2016; MACHELSKA & CELIK, 2016; BALIKI & APKARIAN, 2015; OSSIPOV et al., 2014; BASBAUM et al., 2009; VANDERAH, 2007; LOESER et al., 2001; MILLAN, 1999). A subjetividade da sensação dolorosa se deve ao fato da informação nociceptiva não se destinar apenas às regiões do sistema somatossensorial (sistema que transmite informações táteis, proprioceptivas, nociceptivas, viscerais e térmicas), mas também a regiões que compõem o chamado sistema límbico, o sistema que compreende as várias áreas corticais e subcorticais envolvidas no processamento das emoções (BALIKI AND APKARIAN, 2015; BASBAUM et al., 2009; VANDERAH, 2007; BEYES E BONICA, 2001; MILLAN, 1999). Sendo assim, a dor pode ser modulada por vários fatores cognitivos, tais como distração, atenção, emoções e elementos socioculturais (PIMENTA, 1998; MEINELT et al., 2007; LOESER; TREEDE, 2008; COHEN; MAO, 2014; WIECH, 2016;).

O termo dor é diferente de nocicepção. A nocicepção se refere aos sinais que chegam ao sistema nervoso central (SNC) resultante da ativação de receptores sensoriais especializados periféricos denominados nociceptores (FEIN, 2011). Os nociceptores fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos. A nocicepção, portanto, aparece como o objeto de estudo mais apropriado nas abordagens para o estudo da dor onde são empregados modelos animais, que são incapazes de verbalizar sua percepção do fenômeno doloroso (KAVALIERS, 1988).

Geralmente a dor acompanha a nocicepção (FEIN, 2011). De modo geral, os eventos que modulam a transmissão nociceptiva ocorrem primariamente no corno dorsal da medula espinal e em núcleos do tronco encefálico, por serem essas as principais regiões de entrada de

informações nociceptivas no SNC. Posteriormente, a informação nociceptiva é modulada em centros encefálicos e estruturas corticolímbicas (FEIN, 2011).

Existem diferentes tipos de dor, podendo essa ser classificada quanto a sua intensidade (leve, moderada ou severa), duração (aguda ou crônica) ou tipo (nociceptiva, inflamatória ou neuropática) (DAS, 2015). Independentemente da sua classificação, a dor é a principal razão de procura pelo sistema de saúde e está entre as principais causas de incapacitação e absenteísmo ao trabalho (LANGLEY; RUIZ-IBAN, 2011; PICAUVET; SCHOUTEN, 2003). No Brasil, estima-se que a dor crônica atinja em torno de 22 a 40% da população adulta (LEOPOLDINO et al., 2016; DEPINTOR et al., 2016; COSTA, 2015; DELLAROZA et al., 2013). Neste trabalho será destacada a dor neuropática.

A dor neuropática decorre de lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial, em seus componentes periféricos (dor neuropática periférica) ou no SNC (dor neuropática central) (COLLOCA et al., 2017; NICKEL et al., 2012). A dor neuropática ocorre devido a traumas mecânicos (secção ou constrição em nervo periférico, lesões no SNC), doenças metabólicas como diabetes, doenças nutricionais, alcoolismo, uso de fármacos, exposição a toxinas, neoplasias, lesões vasculares, entre outros (BARON; BINDER; WASNER, 2010). Na dor neuropática, o sistema nervoso responde inapropriadamente ao dano mediante múltiplos mecanismos que resultam em interpretações inadequadas dos impulsos sensoriais e sensações dolorosas espontâneas (MEACHAM et al., 2017; VAN HECKE et al., 2014).

Estima-se que a dor neuropática afeta entre 1.5 a 8% da população mundial, gerando custos significativos para os indivíduos acometidos por ela e aos sistemas de saúde (CHEN ET AL., 2019; ALLEN; SMITH, 2018; COLLOCA et al., 2017; FINNERUP et al., 2015; VAN HECKE et al., 2014; HEHN; BARON; WOOLF, CLIFFORD, 2012). No Brasil, a prevalência estimada de provável dor neuropática é 14,5% (UDALL et al., 2019). É possível que a dor neuropática se torne ainda mais prevalente devido ao maior tempo de vida da população mundial, ao aumento da incidência de diabetes mellitus, e ao maior índice de sobrevivência após quimioterapias para tratamento de cânceres, uma vez que essas condições levam a quadros dolorosos (COLLOCA et al., 2017). Além de redução significativa na qualidade de vida das pessoas acometidas por dor neuropática, frequentemente esse tipo de dor está associada à ansiedade, depressão e distúrbios de sono (COLLOCA et al., 2017; DWORKIN et al., 2007; FINNERUP et al., 2015; ZHAO, H. et al., 2017). É comum aos pacientes que experienciam dor neuropática alterações sensoriais como alodinia (dor frente a um estímulo inócuo) e hiperalgesia (resposta exacerbada frente a um estímulo nocivo) (DAS, 2015), as quais caracterizam o quadro chamado sensibilização (aumento na responsividade de

neurônios à estimulação normal ou recrutamento de uma resposta a estímulos normalmente sublimiares). A sensibilização ocorre na periferia (sensibilização periférica) e no SNC (sensibilização central). A sensibilização central parece ser um fenômeno chave na fisiopatologia da dor neuropática (COLLOCA et al., 2017).

Os mecanismos envolvidos na sensibilização são complexos, multifatoriais e evoluem ao longo do tempo (PASERO, 2004), tornando a dor neuropática complexa e de difícil tratamento. O entendimento incompleto da fisiopatologia da dor neuropática limita as alternativas terapêuticas para esse tipo de dor (GEIS et al., 2017; MEACHAM et al., 2017). A principal abordagem utilizada atualmente no tratamento da dor neuropática é a farmacológica, onde se destaca os fármacos gabapentina e pregabalina (análogos de GABA), e opióides e antidepressivos tricíclicos (COLLOCA et al., 2017; FINNERUP et al., 2015). No entanto, os tratamentos com esses fármacos são inespecíficos, com eficácia limitada e associados a efeitos adversos variados, como sedação, sonolência, taquicardia, náusea, retenção urinária e ganho de peso. Apenas 30 a 50% dos pacientes relatam alívio satisfatório da dor com o uso de um ou mais desses fármacos (COLLOCA et al., 2017; MAGRINELLI; ZANETTE; TAMBURIN, 2013; DWORKIN et al., 2007). Portanto, torna-se necessário maior esclarecimento acerca dos mecanismos patofisiológicos associados ao desenvolvimento e manutenção da dor neuropática, como também ampliar as possibilidades terapêuticas com o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos.

## **1.2 USO DE MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DA DOR NEUROPÁTICA**

Embora os seres humanos possuam a capacidade de verbalização do fenômeno doloroso, os estudos de dor em humanos permitem apenas uma abordagem limitada. Os modelos animais, especialmente roedores, são os mais comumente utilizados na busca de avanços no entendimento dos mecanismos patofisiológicos e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a dor neuropática (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Apesar de não possuírem capacidade de verbalizar sua percepção do estímulo doloroso, os animais exibem respostas motoras similares às dos humanos quando em contato com estímulos nociceptivos, as quais permitem inferir a existência de nocicepção (DUBNER, 1983; KAVALIERS, 1988).

Dentre os modelos de dor neuropática, o modelo de constrição crônica no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction njury*), desenvolvido por BENNETT & XIE (1988), é um dos mais comumente utilizados por simular situações clínicas comuns aos

humanos, como causalgia ou síndrome da dor complexa regional (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Neste modelo, quatro amarraduras com fio de sutura bioabsorvível são colocadas no tronco comum do nervo isquiático (Figura 1), de modo que um segmento de aproximadamente 7 mm desse nervo fica lesionado pelo estrangulamento e pela posterior reação inflamatória local.

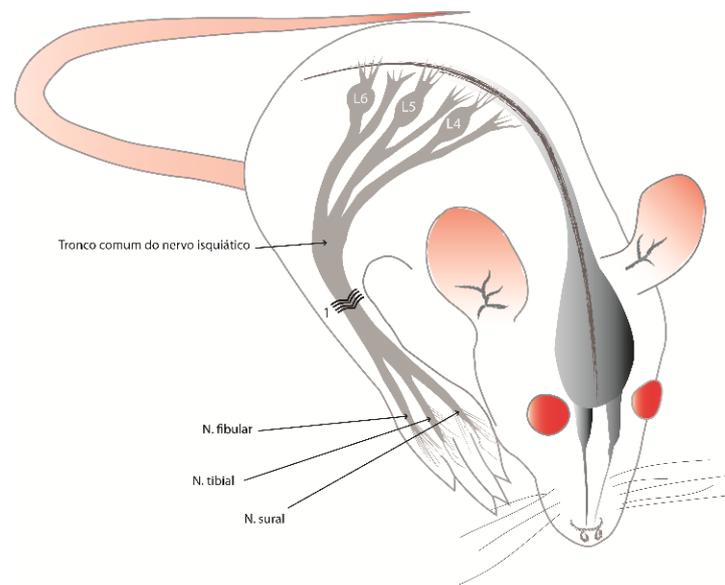


Figura 1: Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinhal lombar, ilustrando a formação do nervo isquiático. Nas raízes dorsais do nervo isquiático estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5, L6) desse nervo, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente se divide também no nervo sural, e o fibular. No tronco comum do nervo isquiático estão mostradas as quatro amarraduras que promovem a constrição nesse nervo (Elaborado pela autora).

Em virtude da lesão nervosa, diversos mediadores químicos são produzidos localmente e atuam tanto no local da lesão como no SNC. Dentre os mediadores químicos, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). A liberação dessas espécies contribui para a hiperalgesia e a alodinia (GRACE et al., 2016; SALVEMINI et al., 2011). Para atender os propósitos desse estudo, será destacada a participação das ROS na dor neuropática.

### 1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SISTEMAS ANTIOXIDANTES: ALTERAÇÕES NA DOR NEUROPÁTICA

A formação de ROS ocorre em virtude dos processos do metabolismo energético celular (Figura 2). A fosforilação oxidativa mitocondrial e a atividade de enzimas pró-oxidantes, como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NADPH oxidases) são algumas das fontes endógenas usuais de geração de ROS, como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (POLJSAK; SUPUT, MILISAV, 2013).

Por sua natureza altamente reativa, as ROS, quando em excesso, podem levar a quadros de estresse oxidativo (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013; POLJSAK et al., 2013; SIES, 2015; GRACE et al., 2016). Por outro lado, em baixas concentrações, as ROS atuam benéficamente em diversas funções fisiológicas, como respostas mitogênicas, ativação de fatores de transcrição e regulação de vias de sinalização intracelular (DROGE, 2002; PIZZINO et al., 2017). De acordo com Poljsak et al. (2013), um ambiente levemente pró-oxidativo é necessário para manter os processos de sinalização em condições ideais, o que sugere que as correções nas concentrações de ROS devem ser sutis.

A homeostase redox das células é cuidadosamente mantida por um elaborado sistema de defesas antioxidantes, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos (POLJSAK et al., 2013). Os antioxidantes são moléculas que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável previnem a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTENDGE, 2015; SALMON et al., 2010). Os antioxidantes possuem papel essencial na regulação da produção de ROS e na proteção do meio intracelular aos danos causados pelo excesso de ROS (PIZZINO et al., 2017; DROGE, 2002). Dentre as primeiras linhas de defesas antioxidantes enzimáticas, destaca-se a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão de  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$ , por sua vez, pode ser eliminado pela catalase ou peroxidases (FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) (Figura 2). Entre os antioxidantes não enzimáticos, destaca-se o ácido ascórbico, a glutathiona e o alfa-tocoferol. A glutathiona é um tripeptídeo capaz de reduzir e regenerar várias moléculas oxidadas, atuando também como um eficiente *scavenger* de ROS (HALLIWELL; GUTTENRIDGE, 2015; SALMON et al., 2010). Os tióis totais, dentre os quais está a glutathiona, são particularmente sensíveis às reações redox e são considerados sensores redox, os quais interagem com diferentes tipos de oxidantes para formar, em diversas situações, uma modificação covalente reversível que inclui a formação de pontes dissulfídicas, principal

mecanismo por meio do qual se pode controlar a função de proteínas (EATON, 2006; DROGE, 2002). Assim, um marcador importante de oxidação de proteínas é o conteúdo de tióis totais (TROMM et al., 2012).

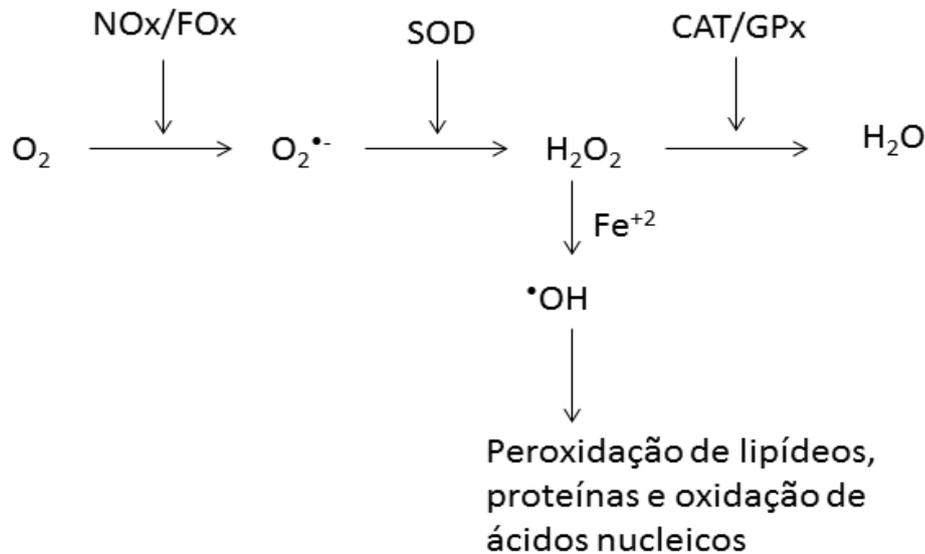


Figura 2: Redução do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) até a formação de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) pela ação de enzimas NADPH oxidases (NOx) e da fosforilação oxidativa (FOx). No esquema é mostrada a formação de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e radical hidroxil ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), assim como a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Adaptado de Grace et al., 2016).

Em condições de dor neuropática, diversos estudos mostram mudanças em antioxidantes e incrementos na formação de ROS, tanto no local da lesão como em regiões do SNC (GUEDES et al., 2008; SCHEID et al., 2013; HORST et al., 2014; KIM, H. Y. et al., 2015; NAIK et al., 2006). O envolvimento do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  no desenvolvimento da sensibilização associada à dor crônica vem sendo bastante destacado (GRACE et al., 2016; KIM, H. Y. et al., 2015; SALVEMINI et al., 2011). O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  parece mediar a potencialização a longo prazo dos neurônios excitatórios do trato espinotalâmico (neurônios que retransmitem informações nociceptivas da medula espinhal para o cérebro) e a depressão a longo prazo em interneurônios inibitórios GABAérgicos da medula espinhal (BITTAR et al., 2017). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  parece aumentar a frequência dos potenciais de ação nos neurônios primários envolvidos na

dor neuropática (SÖZBIR; NAZIROGLU, 2016). Outro parâmetro que sabidamente está alterado na dor neuropática são os tióis totais, reduzidos tanto no nervo quanto na medula espinhal em condição de dor neuropática (BHAT et al., 2016; NAIK et al., 2006).

#### **1.4 POTENCIAL EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTIOXIDANTE DA VITAMINA D**

Como destacado anteriormente, as ROS desempenham papel importante na dor neuropática. Sendo assim, alguns estudos enfocam a administração de compostos com propriedades antioxidantes como uma alternativa para a atenuação da dor neuropática (DROGE, 2002; SALVEMINI et al., 2011; GRACE et al., 2016; PIZZINO et al., 2017; BITTAR et al., 2017; RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018).

A vitamina D (Vit. D), a qual inclui a vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (colecalfiferol) e a vitamina D<sub>2</sub> (Vit. D<sub>2</sub>) (ergocalciferol), é uma vitamina lipossolúvel conhecida por possuir diversos efeitos biológicos no metabolismo do cálcio e do fósforo (NORMAN et al., 1992). No entanto, a Vit. D também parece desempenhar papel importante na dor. Há um número crescente de estudos indicando que a deficiência de Vit. D pode estar associada a várias formas de dor crônica (POISBEAU et al., 2019; RONDANELLI et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2017; BELLEI et al., 2017; YESIL et al., 2018; BASIT et al., 2016; MASCITELLI et al., 2011). Ainda, a suplementação com Vit. D em pacientes com dor provocou redução nos seus escores de dor (DE OLIVEIRA et al., 2017; WU et al., 2016). Em modelo animal, a administração crônica de vitamina D<sub>3</sub>, a forma biologicamente ativa da Vit. D, atenuou os escores comportamentais de dor neuropática em ratos com CCI (BANAFSHE et al., 2018). Ainda, a Vit. D parece atuar como modulador de respostas inflamatórias e imunológicas (SASSI et al., 2018; COLOTTA et al., 2017) e, recentemente, foi sugerido papel modulador da Vit. D em genes que codificam peptídeos opioides, os quais possuem papel importante na analgesia (POISBEAU et al., 2019).

A Vit. D também parece possuir potencial antioxidante (NAKAI et al., 2014; UBERTI et al., 2014; ASEMI et al., 2013; MASSZI et al., 2013; SALUM et al., 2013). Foi demonstrado que essa vitamina desempenha papel importante na regulação das ROS, o que parece ocorrer mediante seu controle sobre a expressão de antioxidantes celulares como parte da sua função para manter a estabilidade fenotípica das vias de sinalização celular e a função mitocondrial (BERRIDGE, 2017; 2016; 2015). Nesse contexto, foi demonstrado que a Vit. D regula a expressão da  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, glutamato cisteína ligase e glutathione

reduzida, as quais desempenham papel importante na síntese de glutatona. Ainda, a Vit. D aumenta a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, o que também contribui para o aumento na formação de glutatona (BERRIDGE, 2017; 2016; 2015). Segundo este autor, a Vit. D participa na regulação da expressão de muitos dos sistemas antioxidantes que impedem o estresse oxidativo por remover ROS e reverter as alterações oxidativas que ocorrem durante a sinalização normal dessas espécies. No sangue, uma revisão sistemática recente e uma meta-análise de ensaios clínicos mostraram que a suplementação com Vit. D aumentou a capacidade antioxidante total e a glutatona, enquanto diminuiu a peroxidação de lipídeos, um marcador de danos a lipídios causados por ROS (SEPIDARKISH et al., 2019).

Assim, tendo a Vit. D propriedades antioxidantes, e as ROS estando envolvidas na dor neuropática, postulou-se que a antinocicepção induzida pela vitamina D envolveria alterações em parâmetros de estresse oxidativo no tecido nervoso. Desta forma, o presente estudo avaliou o efeito do tratamento com Vit. D<sub>3</sub> sobre nocicepção, funcionalidade do nervo isquiático e marcadores pró-oxidante e antioxidante em nervo isquiático lesionado e medula espinhal de ratos com dor neuropática induzida por CCI, a fim de demonstrar a relação entre essas variáveis após administração da vitamina.

---

## **2. HIPÓTESE**

Como a Vit. D parece induzir analgesia em certas condições de dor, espera-se que a administração oral dessa vitamina em ratos com dor neuropática induzida por CCI aumente as sensibilidades mecânica e térmica, e o índice funcional do nervo isquiático, reduzidos pela CCI. Como a Vit. D possui ação antioxidante e é lipossolúvel, e é sabido que na dor neuropática há alterações em ROS, espera-se que o tratamento com essa vitamina provoque alterações no quadro oxidativo no nervo isquiático e na medula espinal lombossacral, a região de entrada das informações sensoriais do nervo isquiático, e que as mudanças sejam na direção oposta àquela induzida pela CCI. Espera-se ainda que o efeito benéfico da Vit. D ocorra sem causar sinais de toxicidade aos animais.

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo avaliou os efeitos da administração oral de Vit. D<sub>3</sub> sobre parâmetros nociceptivo, de recuperação funcional do nervo isquiático, e de estresse oxidativo em nervo isquiático e medula espinal de ratos sem e com CCI no nervo isquiático direito, considerando para isso os períodos experimentais de 7 e 28 dias de tratamento para determinar a variação temporal dos indicadores.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar os efeitos da administração oral de Vit. D<sub>3</sub>, na dose de 500 unidades internacionais (UI) por kg, por dia (500 UI/kg/dia), durante os períodos de 7 e 28 dias, em ratos sem e com CCI no nervo isquiático direito, mediante avaliação de:

- a) Parâmetros nociceptivos, pelo uso dos testes de von Frey eletrônico e placa quente, que avaliam sensibilidades mecânica e térmica, respectivamente;
- b) Índice funcional do nervo isquiático (IFI), que avalia as alterações na marcha decorrentes da lesão nervosa por meio do teste de impressão das pegadas;
- c) Parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático lesionado, mediante determinação dos valores de hidroperóxidos lipídicos e da capacidade antioxidante total (TAC, do inglês *total antioxidant capacity*);
- d) Parâmetros de estresse oxidativo no segmento lombossacral da medula espinal, mediante determinação da formação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos lipídicos, e TAC e conteúdo de tióis totais.

3.2.2 Avaliar a possível toxicidade da administração oral de Vit. D<sub>3</sub> (500 UI/kg/dia) por 28 dias em ratos sem e com CCI, mediante determinação da:

- a) Atividade da alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST), bilirrubina direta e creatinina, em plasma.

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS: PROCEDÊNCIA E MANUTENÇÃO

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (#32295, ANEXO I), foram solicitados ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) dessa Universidade 72 ratos da linhagem *Wistar*, machos, com peso de 180-250g e 60 dias de vida. Os animais foram mantidos no ratário do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, acomodados em caixas criadouros forradas com maravalha, com livre acesso à água e alimentação, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 07h00min às 19h00min) e temperatura ambiente de  $22\pm 2$  °C. A limpeza das caixas foi realizada, no máximo, a cada dois dias. O transporte dos animais para o Laboratório de Neurobiologia Comparada ocorreu nos dias dos testes, da cirurgia e/ou morte.

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos nos grupos experimentais descritos a seguir e mostrados na Figura 3:

- Grupo controle: ratos que não sofreram manipulação cirúrgica;
- Grupo sham: ratos que foram submetidos à incisão cutânea e subcutânea longitudinal na pata posterior direita para isolamento e manipulação do nervo isquiático, sem receber qualquer constrição nesse nervo;
- Grupo CCI: ratos que foram submetidos à incisão cutânea e subcutânea longitudinal na pata posterior direita para isolamento do nervo isquiático, e recebeu nesse nervo 4 amarraduras em seu tronco comum.

Os animais destes grupos experimentais receberam um dos tratamentos listados abaixo, de acordo com o objetivo do experimento realizado:

- Solução veículo: 0,3 mL de azeite de oliva, administrada por 7 ou 28 dias;
- Vit. D<sub>3</sub> (500 UI/kg/dia) diluída em solução veículo, administrada por 7 ou 28 dias.

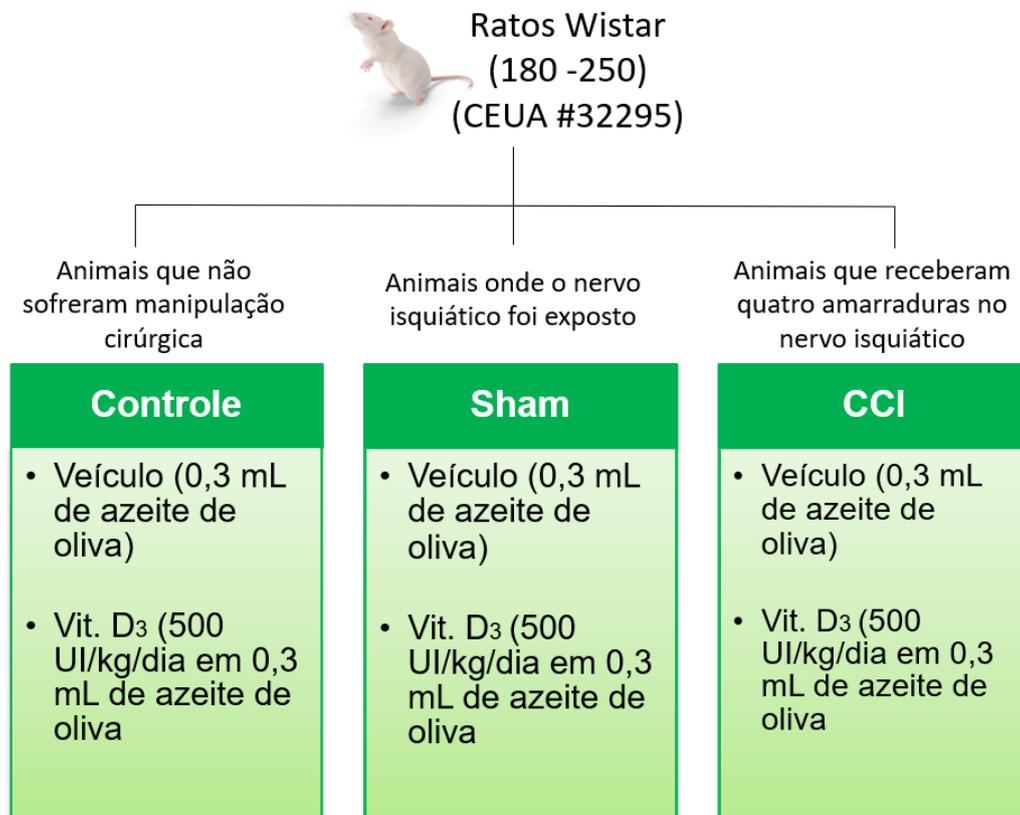


Figura 3: Esquema mostrando os grupos experimentais e os tratamentos usados na pesquisa.

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação 7 e 28 dias após o início do tratamento, o que corresponde a 8 e 29 dias após a cirurgia, para a obtenção do nervo isquiático direito, do segmento lombossacral da medula espinal, e do plasma. Cada grupo experimental foi composto por seis (06) animais.

### 4.3 CONSTRIÇÃO NO NERVO ISQUIÁTICO

O procedimento de constrição no nervo isquiático foi realizado segundo a técnica descrita por BENNETT & XIE (1987), com algumas modificações (RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018; RIFFEL et al., 2016; HORST et al., 2014). De forma resumida, os ratos foram inicialmente anestesiados com solução mista de quetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Após anestesia, o rato foi posicionado em decúbito dorsal para a realização da tricotomia em sua coxa direita (Figura 4A). A intervenção foi

iniciada pela assepsia da pele com álcool iodado 2%, seguida de incisão cutânea e subcutânea longitudinal na região do terço médio da coxa (Figura 4B,C). Nos ratos do grupo sham, o nervo isquiático foi apenas visualizado e manipulado (Figura 4D). Nos animais do grupo CCI, o nervo isquiático recebeu 4 amarraduras com fio de sutura *catgut* cromado 4.0 tipo c bioabsorvível (Shalon) em seu tronco comum, sendo a distância entre os nós cerca de 1 mm (Figura 4E,F). Assim, o comprimento do nervo afetado foi de aproximadamente 7,0 mm. O grau de constrição usado retarda, mas não interrompe totalmente a circulação sanguínea da superfície epineural.

Após a manipulação ou constrição no nervo isquiático, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível 4.0 (Somerville) e o antimicrobiano rifamicina (Rifocina Spray® 10 mg/mL, 1 jato) foi aplicado sobre a pele suturada (Figura 4G,H). Os animais do grupo controle não sofreram intervenção cirúrgica.

Ressalta-se que todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo pesquisador, para garantir o mesmo grau de constrição nos animais CCI e a padronização da manipulação nos ratos do grupo sham.

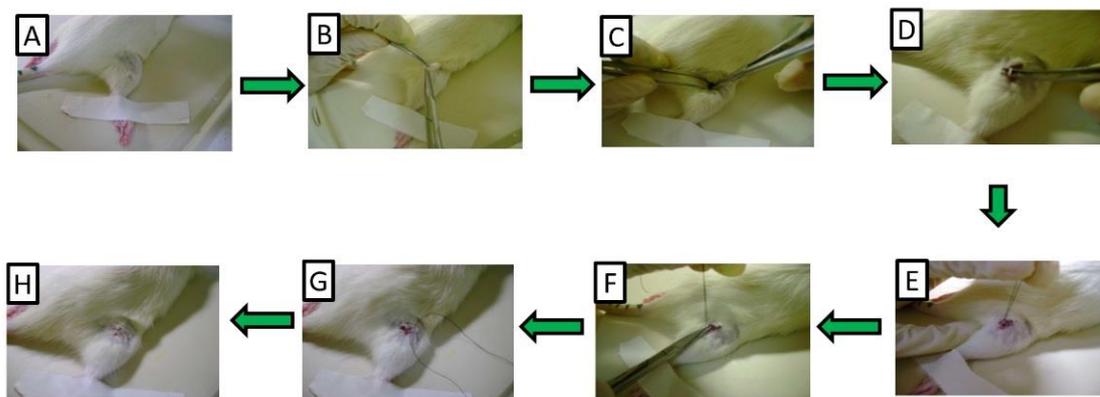


Figura 4: As fotografias mostram a sequência dos procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos. (A) Pata posterior direita de um rato em posição de decúbito dorsal mostrando a tricotomia na região média da coxa. (B) Início da incisão do tecido cutâneo na região média da coxa direita de um rato. (C) Processo de afastamento dos músculos bíceps femoral e semitendinoso na região média da coxa direita de um rato. (D) Exposição do tronco comum do nervo isquiático na região média da coxa direita de um rato. (E) Realização do primeiro nó no tronco comum do nervo isquiático direito. (F) Realização do quarto nó no tronco comum do nervo isquiático direito. (G) Início da sutura do tecido cutâneo na região média da coxa direita de um rato. (H) Pata direita de um rato mostrando a sutura na região média da coxa (Elaborado pela autora).

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acomodados nas caixas com maravalha e mantidos em observação no Laboratório de Neurobiologia Comparada até a recuperação da anestesia. Neste período, os ratos receberam alimento e água *ad libitum*. Após a recuperação da anestesia, os animais receberam administração de aspirina por via oral na dosagem de 100 mg/kg de peso corporal. Em seguida, os ratos foram levados ao ratário, onde permaneceram até o dia da morte. A administração de Vit. D<sub>3</sub> iniciou no dia seguinte à cirurgia. Durante o período de tratamento, os ratos receberam diariamente as soluções veículo ou de Vit. D<sub>3</sub>, de acordo com o grupo experimental a que pertenciam. Os ratos não receberam nenhuma terapia analgésica para que os efeitos da lesão nervosa e tecidual não fossem mascarados por influências externas ao tratamento. Os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas no item 4.1 "Animais: Procedência e Manutenção". A mortalidade durante o estudo foi zero, ou seja, não correu perda de rato durante ou após o processo cirúrgico.

#### **4.4 ADMINISTRAÇÃO DE VEÍCULO E VITAMINA D**

No presente estudo foi utilizada Vit. D<sub>3</sub> (colecalfiferol- Sigma), por ser esta a forma biologicamente ativa da vit. D. A vitamina D<sub>3</sub> foi administrada por *gavage*, na dose de 500 UI/kg/dia (BANAFSHE et al., 2018). Devido à sua lipossolubilidade, a Vit. D<sub>3</sub> foi diluída em solução veículo, que consistia em 0,3 mL de azeite de oliva, obtido comercialmente (Monde, Argentina). O preparo da solução de Vit. D<sub>3</sub> ocorreu na semana das administrações, e a solução permaneceu armazenada na geladeira (20°C) em frasco de cor âmbar e protegida da luz por papel laminado. A solução veículo, que consistia apenas em azeite de oliva, foi também armazenada em frasco de cor âmbar e protegida da luz por papel laminado, sendo guardada em geladeira (20 °C).

Nos dias das administrações, as soluções foram mantidas no mínimo 1h sob agitação em temperatura ambiente, protegidas da luz por papel alumínio, antes de serem administradas por *gavage* aos ratos. As administrações ocorreram a partir do primeiro dia após a cirurgia e foram realizadas diariamente, às 17h, pelo mesmo pesquisador (BANAFSHE et al., 2018; SCHEID et al., 2018; HORST et al., 2017; RIFFEL et al., 2016).

## 4.5 PARÂMETROS NOCICEPTIVOS

### 4.5.1 Determinação do limiar mecânico

Para avaliação da sensibilidade mecânica se determinou o limiar de resposta da pata direita (ipsilateral à lesão nos ratos com lesão tecidual ou nervosa), mediante utilização do aparelho de von Frey eletrônico (Insight, Brasil).

Para a realização do teste, os ratos foram colocados individualmente em caixas de vidro (12 x 20 x 20 cm) apoiadas sobre uma superfície elevada e revestida por tela metálica. Neste ambiente, os animais foram aclimatados por 20 minutos. O teste consistiu na aplicação de forças crescentes na região plantar da pata posterior direita do animal (Figura 5). A resposta foi considerada positiva quando o rato realizou o movimento de retirada da pata estimulada durante o teste. Neste momento, a intensidade da pressão exercida foi automaticamente registrada pelo aparelho. Porém, a resposta foi desconsiderada se seguida de caminhada. Neste caso, o teste foi refeito. O teste foi repetido cinco vezes, uma vez a cada 30 s, no mesmo animal e na pata ipsilateral à lesão. A média das cinco leituras foi considerada como o limiar de resposta do animal em experimentação. O teste foi realizado sempre pela mesma pessoa, em ambiente silencioso e ao início da manhã.

O teste foi realizado antes do procedimento cirúrgico (pré-lesão) e no 4º e 8º dia pós-cirurgia, no grupo que recebeu tratamento por 7 dias, e aos 4, 8, 15, 22 e 29 dias no grupo que recebeu tratamento por 28 dias. Os resultados do teste de von Frey foram expressos como média±erro padrão da média das respostas pré e pós-lesão dos ratos nos períodos considerados.

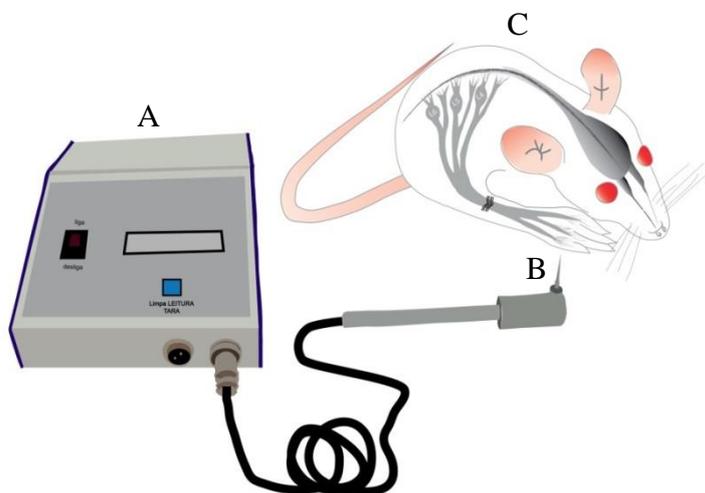


Figura 5: Esquema mostrando o teste de von Frey eletrônico, onde se nota o aparelho de von Frey (A), a ponta (B) usada para aplicar força à região plantar da pata direita de um rato com CCI (C). Para detalhes da CCI, consultar a Figura 1 (Elaborado pela autora).

#### 4.5.2 Determinação do limiar térmico

Para avaliação da sensibilidade térmica nos animais dos diferentes grupos experimentais, os mesmos foram submetidos ao teste da placa quente (Insight, Brasil). Para isto, os animais foram inicialmente aclimatados um por um, por um período de 20 minutos, à placa em temperatura ambiente. Após este procedimento, a placa foi aquecida e mantida à temperatura de 50 °C. Então, cada animal foi colocado sobre esta placa (Figura 6) e o tempo para o reflexo de retirada de uma das patas foi determinado e anotado. O rato foi retirado imediatamente do contato com a placa quente logo que manifestava a ação de erguer uma das patas, para não lesionar os tecidos com a alta temperatura.

O teste foi realizado em ambiente silencioso, no início da manhã e pelo mesmo pesquisador. Da mesma forma que no teste de sensibilidade mecânica, o teste foi realizado antes do procedimento cirúrgico (pré-lesão) e no 4º e 8º dia pós-cirurgia, no grupo que recebeu tratamento por 7 dias, e aos 4, 8, 15, 22 e 29 dias no grupo tratado por 28 dias. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média da latência de resposta dos ratos.

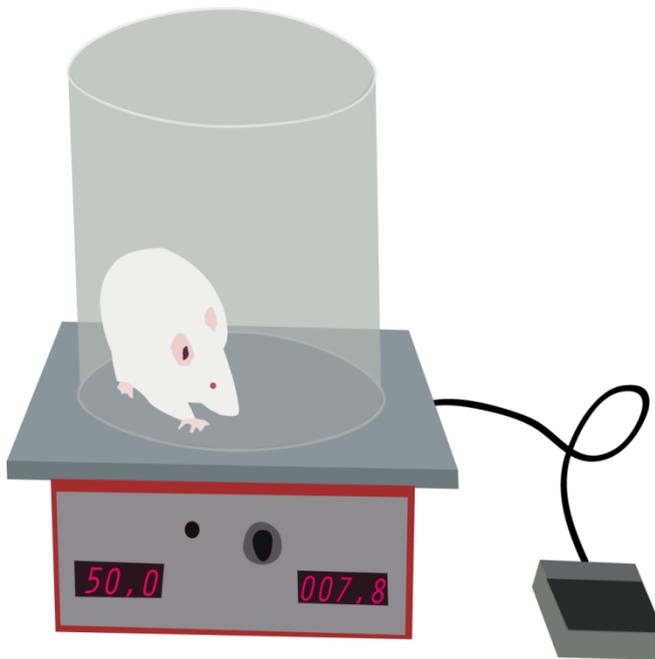


Figura 6: Esquema mostrando o aparelho usado no teste da placa quente. Note o rato sobre a placa quente, dentro do cilindro de contenção do animal. No esquema se pode ainda visualizar os marcadores de temperatura (50,0) e tempo (007,8), e o pedal de controle do aparelho (Elaborado pela autora).

#### 4.6 Determinação do índice funcional do isquiático (IFI)

A avaliação funcional do nervo isquiático foi realizada pelo teste da marcação das patas (do inglês, *walking track analysis*), descrito por de Medinacelli (1982). Este teste constitui um método de análise funcional de nervo, que avalia alterações de marcha decorrentes de lesão nervosa por meio da impressão de pegadas. Este teste é normalmente empregado para avaliar as consequências funcionais de lesão direta no nervo isquiático.

No teste, o animal foi colocado em um corredor de madeira (8,5 x 100 cm) com acesso a um ambiente escuro (Figura 7). O chão do corredor foi forrado com uma tira de papel branco da mesma medida e o rato a ser testado teve suas patas traseiras marcadas com tinta preta. A seguir, o animal foi solto no início do corredor por onde pode se locomover em direção ao ambiente escuro, ao final do corredor, deixando impressas as marcas de suas patas traseiras.



Figura 7: Fotografia do aparato usado no teste de marcação das patas. Note o rato no campo iluminado, cujo assoalho se encontra coberto por tira de papel branco com as mesmas dimensões da pista de caminhada. No final da pista se observa a entrada para a caixa escura.

Todos os ratos foram previamente treinados com três passagens pelo corredor, permitindo a adaptação e exploração do local. No dia de teste, o rato deixava impressas várias pegadas na tira de papel branco devido à tintura de suas patas posteriores. Porém, foram selecionadas para análise as pegadas com qualidade e clareza de impressão. Na análise foram aferidas as patas operada (direita) e contralateral (esquerda). As aferições foram feitas sempre pelo mesmo examinador e o IFI foi calculado conforme fórmula a seguir:

$$\text{IFI} = -38,3[(\text{EPL}-\text{NPL})/\text{NPL}] + 109,5[(\text{ETS}-\text{NTS})/\text{NTS}] + 13,3[(\text{EIT}-\text{NIT})-\text{NIT}] - 8,8$$

Na fórmula, a pata esquerda, ou normal, corresponde à letra N, e a pata lesionada, ou experimental, à letra E. Foram realizadas as medidas: da extensão da pegada (PL: distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), da largura da pegada (TS: distância entre o 1º e 5º dedo), e da distância entre os dedos intermediários (IT: 2º e 4º dedo) das patas traseiras (Figura 8). Os valores obtidos por esta fórmula foram considerados como um índice da condição funcional do nervo isquiático, expresso em déficit funcional. Variações de 0 a  $\pm 11$  estão nos desvios de normalidade da pegada. O zero representa função normal e o  $-100$  representa perda total da função. Os valores intermediários correspondem a déficits parciais de função. O teste foi realizado antes da cirurgia (pré-lesão) e no 4º e 8º dia pós-cirurgia, nos animais tratados por 7 dias, e nos dias 4, 8, 15, 22 e 29 após a cirurgia, nos animais tratados por 28 dias. O teste sempre foi realizado no primeiro horário da manhã e pelo mesmo experimentador.

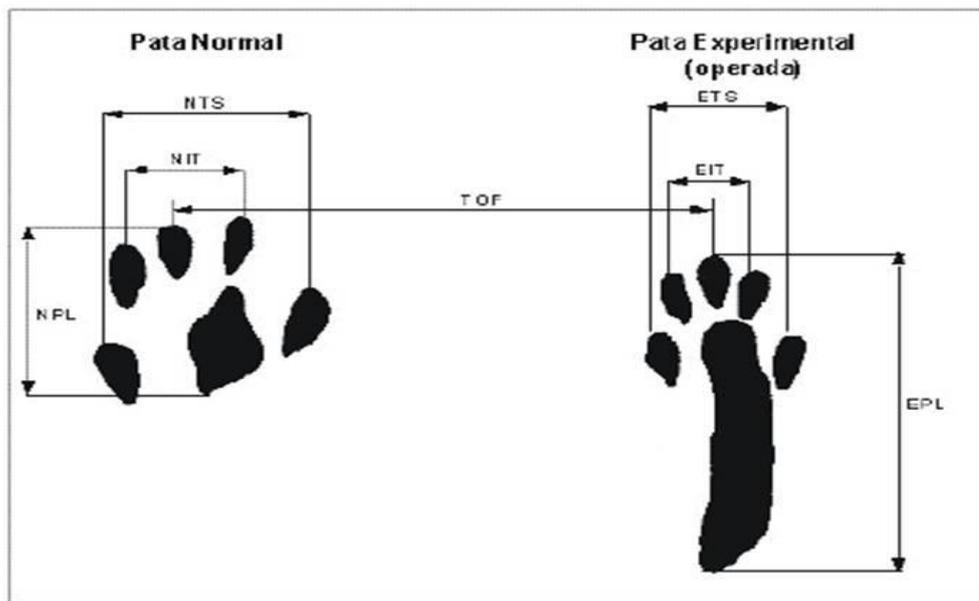


FIGURA 8: Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Isquiático (IFI). N: normal; E: experimental (operada); TS: abertura total dos dedos (1º a 5º); IT: abertura dos dedos intermediários (2º ao 4º); PL: comprimento da pegada (Adaptado de Monte-raso et al., 2006).

Para facilitar o entendimento do leitor, a Figura 9 mostra linha temporal da realização dos testes de sensibilidade dolorosa (testes de von Frey eletrônico e da placa quente) e da

marcação das patas (IFI). Nela é mostrada ainda as datas da realização da cirurgia, o dia da morte dos ratos para a coleta dos tecidos usados nas determinações bioquímicas do estudo, e os dias de administração oral da Vit. D<sub>3</sub>.

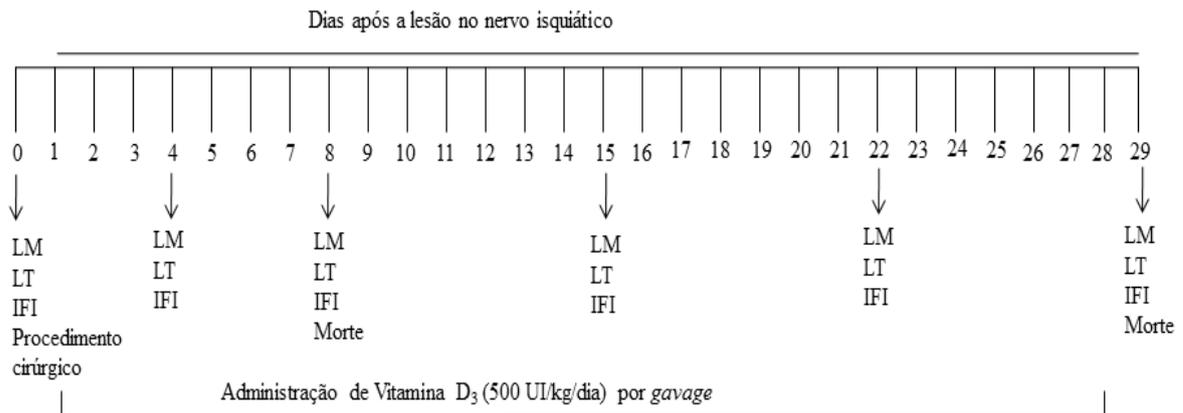


Figura 9 – Esquema temporal mostrando os dias das avaliações dos limiares mecânico (LM) e térmico (LT), do índice funcional do nervo isquiático (IFI), da realização do procedimento cirúrgico, morte, e dias de administração de vitamina D<sub>3</sub>, por *gavage*, na dose de 500 UI/kg/dia.

#### 4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após o período experimental, os ratos foram mortos por decapitação. Em seguida, o sangue foi coletado em tubos *ependorfs* individuais contendo anticoagulante heparina. O sangue foi imediatamente centrifugado, por 20 minutos, a 1000 xg, em centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B- Rotor SM 24). Após esse procedimento, o plasma foi coletado, aliquotado e armazenado à temperatura de -70 °C.

De cada rato foi ainda coletado um segmento ( $\pm 1,5$  cm) do nervo isquiático lesionado (nervo direito) localizado acima do sítio de lesão, e o segmento lombossacral da medula espinal. A medula espinal foi dividida em três partes. Uma das partes foi utilizada para a determinação dos valores de O<sub>2</sub><sup>•</sup>. A segunda parte foi usada para a determinação dos valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essas duas partes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas intactas à temperatura de -70 °C. A terceira parte da medula espinal e o segmento do nervo isquiático lesionado foram homogeneizados e usados para a determinação da TAC e hidroperóxidos lipídicos. O homogeneizado da medula espinal foi também usado para determinar os valores de tióis totais. A homogeneização dos tecidos foi realizada em solução contendo cloreto de

potássio (KCl) 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 100 mM, seguida de centrifugação a 1000 g, por 20 minutos, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70 °C (BUEGE; AUST, 1987).

## 4.8 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.8.1 Formação de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

A formação de  $O_2^{\bullet-}$  (SAG, do inglês *superoxide anion generation*) foi estimada pela redução de azul de nitrotetrazol (NBT), conforme técnica descrita por Wang et al. (1998). O método consistiu na reação de cortes de medula espinal com NBT, após incubação de 90 minutos, para formação de formazan, o indicador da formação do  $O_2^{\bullet-}$ . A absorbância do formazan foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A quantidade de formazan reduzido pelo  $O_2^{\bullet-}$  foi calculada com o emprego da fórmula a seguir:

$$\text{Redução a formazan} = A \times V / (T \times Wt \times \epsilon \times l)$$

Na fórmula, o A representa a absorbância do formazan, V o volume de solução, T o período de incubação das amostras com NBT, Wt o peso do tecido,  $\epsilon$  o coeficiente de extinção molar ( $0,72 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}$ ), e l representa o caminho óptico. Os resultados foram expressos em picomol por minuto por miligrama de peso do tecido.

### 4.8.2 Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

O ensaio para mensurar o  $H_2O_2$  se baseou na oxidação do vermelho de fenol por  $H_2O_2$ , mediado pela peroxidase de rabanete. O ensaio foi conduzido conforme técnica descrita por Pick & Keisari (1980), com pequenas modificações (SCHEID et al., 2014). Para tanto, fatias finas de medula espinal foram incubadas em tampão dextrose-fosfato (5 mM; 10 mM, pH = 7,0), por 30 minutos, sob agitação. Após este período, o meio de incubação foi coletado e adicionado à solução contendo vermelho de fenol (0,28 mM) e peroxidase de rabanete (8,5 U/mL). Após 5 minutos de incubação, adicionou-se a mistura hidróxido de sódio (1,0 M) e se realizou a leitura da absorbância, em comprimento de onda de 610 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Os resultados foram expressos em micromols de peróxido por grama de tecido.

### 4.8.3 Hidroperóxidos lipídicos

O método do xilenol laranja (XO), descrito por Jiang et al. (1991) e adaptado por Sodergren et al. (1998), se baseia na oxidação do  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$  na presença de lipoperóxidos, em pH ácido, formando complexos de  $Fe^{+3}$ -xilenol laranja. Em solução ácida, o corante mostra pico a 560 nm e a absorbância cresce linearmente com o aumento da concentração do corante.

As amostras de tecidos foram diluídas, em proporção de 1:10, e separadas em 2 grupos: no primeiro foi acrescentado metanol absoluto (MEOH), e no segundo, trifetilfosfina (TEP) 10 mmol/L. Ambos os grupos foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, foi pipetado, em microplaca, 10 µl de amostra em quadruplicata (uma duplicata com o metanol, e outra duplicata com o TEP), adicionando-se em seguida 90 µl do reagente de trabalho (RT-XO). Este consistiu em uma mistura de 81% de MEOH 90%, XO 2 mmol/L para concentração final de 100 µM,  $H_2SO_4$  1 mmol/L para concentração final de 25 mmol/L, BHT 40 mmol/L para concentração final de 4 mmol/L e sulfato ferroso amoniacal 10 mmol/L para concentração final de 250 µmol/L.

A placa foi agitada por 30 minutos, em temperatura ambiente e, em seguida, se realizou a leitura em leitora de placas a 570 nm (Zenyth 200, BiochromInc, UK). Para os cálculos, foram descontados os valores de absorbância com TEP dos valores obtidos das duplicatas com MEOH. O resultado foi expresso em nmol por grama de tecido.

### 4.8.4 Capacidade antioxidante total

O método da capacidade antioxidante total (TAC), adaptado de Erel (2004), consistiu no branqueamento da cor característica do reagente 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) ( $ABTS^{*+}$ ) pelos antioxidantes presentes na amostra. Esta reação foi monitorada espectrofotometricamente a 660 nm (aparelho Zenyth 200, BiochromInc, UK) e a taxa de branqueamento foi inversamente relacionada à TAC da amostra. A velocidade da reação foi calibrada com Trolox, que é largamente utilizado como um padrão para os ensaios de medição tradicional de capacidade antioxidante. Os resultados foram expressos em equivalentes de micromol de Trolox por grama de tecido. O ensaio tem uma excelente precisão, superior a 97%.

#### 4.8.5 Tióis totais

A medida de tióis totais foi conduzida conforme descrito por Aksenov & Markesbery (2001). Para tanto, a amostra foi misturada a tampão PBS/EDTA (pH = 7,5) e a ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB, 10 mM). Após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente, as absorvâncias foram lidas a 412 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A medida de TNB formado foi calculada conforme a fórmula:

$$\text{TNB} = (A_{412} - A_{412\text{sem proteína}} - A_{412\text{sem DTNB}}) / \Delta_{412\text{TNB}}, \text{ onde:}$$

$\Delta_{412\text{TNB}} = 14.150 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ,  $A_{412}$  é a absorvância da amostra;  $A_{412\text{sem proteína}}$  é a absorvância do meio reacional sem amostra;  $A_{412\text{sem DTNB}}$  é a absorvância do meio sem DTNB. Os resultados foram expressos em mmol por grama de tecido.

#### 4.9 INDICADORES DE FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL

Para avaliar um possível efeito tóxico do tratamento com Vit. D<sub>3</sub> por 28 dias foi determinado, em plasma, as atividades das enzimas ALT, AST e bilirrubina direta, como indicadores de função hepática, e creatinina, como indicador de função renal. As determinações foram realizadas por meio de *kits* comerciais (LABTEST), seguindo as recomendações do fabricante.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DO PESO CORPORAL

Para acompanhamento do ganho de peso corporal nos ratos usados no presente estudo, se fez a pesagem de todos os animais em diferentes momentos. O peso corporal dos ratos foi avaliado no dia 0, antes da realização da cirurgia, e nos dias 8, 15, 22 e 29 após a CCI. A última pesagem dos ratos ocorreu na manhã da realização da morte.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Previamente a realização do estudo se fez o cálculo do “n” (número mínimo de animais) utilizando o software WIN PEPI, versão 9.1. Este cálculo foi baseado em dados de

estudos prévios (RIFELL et al., 2015; COURTES et al., 2015; Da ROSA et al., 2014). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90%, desvio padrão assumido de 0,01. Assim, foi obtido número amostral 6 por grupo experimental. Nenhuma perda foi assumida para esse estudo.

Para a análise estatística dos dados nociceptivos e do IFI, os mesmos foram analisados por dois pesquisadores independentes, um dos quais era cego aos grupos experimentais. Quando houve inconsistência nos resultados dos dois pesquisadores, um terceiro pesquisador analisou os dados, e o resultado final foi a média dos resultados obtidos pelos três pesquisadores.

As análises estatísticas foram realizadas usando SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL) para Windows. A distribuição gaussiana normal dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, enquanto o teste de Levene foi usado para analisar a homogeneidade da variância. Os resultados dos testes de nocicepção (von Frey e placa quente) e IFI foram analisados pelo emprego de ANOVA de medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey. Para a análise dos resultados dos parâmetros oxidativos e ganho de peso corporal, a comparação dos resultados se deu mediante emprego do teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias (fatores: lesão e tratamento). Havendo diferença estatisticamente significativa, foi utilizado o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou  $P < 0,05$ . Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

## **4.12 DISPOSIÇÃO FINAL DOS RESÍDUOS DA PESQUISA**

### **4.12.1 Resíduos químicos**

Os resíduos químicos foram acondicionados em embalagem adequada, previamente identificada, e encaminhados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de sua eliminação.

### **4.12.2 Resíduos biológicos**

O lixo biológico, após acondicionamento correto e identificação, foi encaminhado ao CREAL do Instituto de Ciências Básicas da Saúde para sua devida eliminação.

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PARÂMETROS NOCICEPTIVOS

#### 5.1.1 Limiar mecânico

No limiar mecânico, a ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tratamento ( $F_{2,53} = 234,136$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 10). O pós-teste mostrou que nos ratos CCI que receberam administrações de veículo, o limiar mecânico estava reduzido por aproximadamente 67% no dia 4. Nesse dia, a redução foi em torno de 52% nos animais CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub>, comparados aos valores obtidos na pré-lesão e grupo controle. Enquanto a diminuição no limiar mecânico foi 64% nos ratos CCI tratados com veículo, a queda foi apenas 38% nos ratos que receberam Vit. D<sub>3</sub> por 7 e 14 dias (limiares medidos nos dias 8 e 15 após a CCI), comparado a valores obtidos na pré-lesão e grupo controle. Nos dias 22 e 29 após a CCI, a redução no limiar mecânico foi 56% nos ratos CCI tratados com veículo, mas apenas 23% nos ratos CCI que receberam Vit. D<sub>3</sub>, comparado a valores obtidos na pré-lesão e grupo controle. A comparação entre ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub> e veículo revelou que a vitamina induziu acréscimo de 43% no limiar mecânico no dia 4, 72% nos dias 7 e 15, e 74% nos dias 22 e 29 após a CCI.

Os ratos do grupo sham exibiram redução (20%) no limiar mecânico aos 4 dias após a lesão tecidual, comparado a valores obtidos na pré-lesão e grupo controle. A queda ocorreu tanto nos ratos sham tratados com veículo como nos que receberam Vit. D<sub>3</sub>. Aos 8 dias, a queda foi 16% e 13% nos ratos sham tratados com veículo e Vit. D<sub>3</sub>, respectivamente. Nenhuma alteração ocorreu no limiar mecânico de ratos sham tratados com veículo e vitamina nos demais períodos avaliados. O limiar mecânico não exibiu alterações estatisticamente significativas no grupo controle.

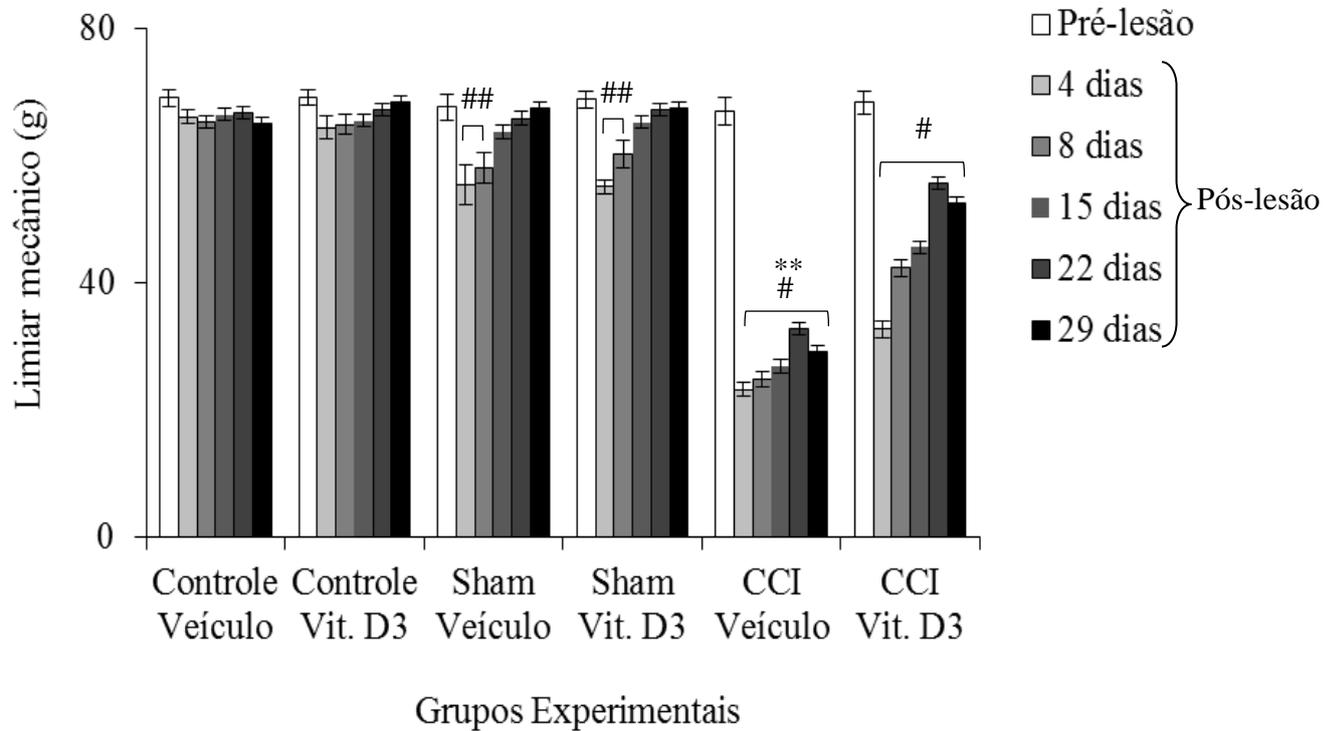


Figura 10: Medida do limiar mecânico em ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. Os limiares foram avaliados antes da cirurgia (pré-lesão) e aos 4, 8, 15, 22 e 29 dias após a CCI. Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). #P<0,05 comparado a ratos controle e sham. ##P<0,05 comparado a ratos controle. \*\*P<0,05 comparado a ratos CCI tratados com vitamina do mesmo período experimental (ANOVA de medidas repetidas seguido de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

### 5.2.2 Limiar térmico

No limiar térmico, a ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tratamento ( $F_{2,53} = 2,568$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 11). O pós-teste revelou que o limiar reduziu significativamente nos animais CCI tratados com veículo por 3 e 7 dias (medidas do limiar realizadas nos dias 4 e 8). Nesses períodos, a redução no limiar térmico foi 23% e 40%, respectivamente, comparado a valores obtidos na pré-lesão. Nos dias 4 e 8, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos animais CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub>. A comparação entre ratos CCI tratados com veículo e Vit. D<sub>3</sub> revelou que a administração de vitamina proporcionou acréscimo de 39% e 80% no limiar térmico medido nos dias 4 e 8, respectivamente. Nos demais dias avaliados, o limiar térmico não variou significativamente nos ratos CCI tratados com veículo e Vit. D<sub>3</sub>. Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi encontrada em ratos controle e sham.

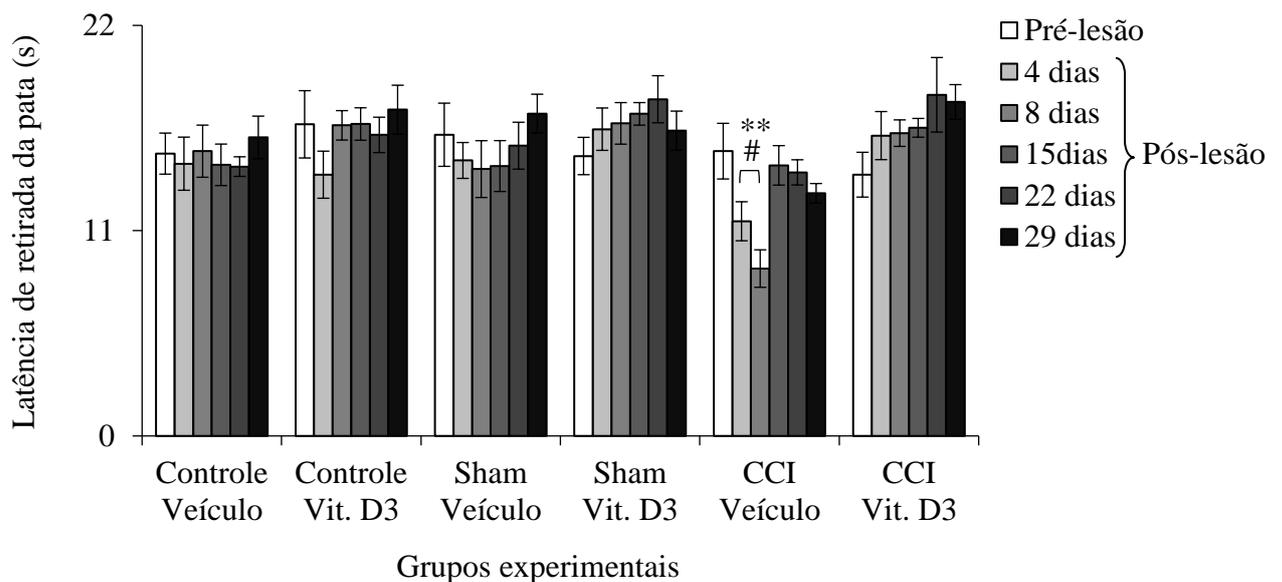


Figura 11: Medida da latência de retirada da pata (limiar térmico) em ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. Os limiares foram avaliados antes da cirurgia (pré-lesão) e aos 4, 8, 15, 22 e 29 dias após a CCI. Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). #P<0,05 comparado a ratos controle e sham. \*\*P<0,05 comparado a ratos CCI tratados com vitamina do mesmo período experimental (ANOVA de medidas repetidas seguido de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

### 5.3 Índice Funcional do Isquiático (IFI)

Na análise dos resultados do IFI, a ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tratamento ( $F_{2,53} = 3916,512$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 12). O pós-teste mostrou que os valores do IFI nos grupos controle e sham foram próximos de zero em todos os períodos experimentais analisados, o que indica normalidade de função no nervo isquiático desses ratos. Porém, o IFI reduziu nos ratos CCI. Nos dias 4, 8, 15, 22 e 29 após a cirurgia, os valores do IFI foram próximos de -100 nos ratos CCI que receberam veículo e Vit. D<sub>3</sub>, o que indica perda de funcionalidade no nervo. Contudo, observou-se alguma recuperação no IFI de ratos que receberam administração de Vit. D<sub>3</sub>. A comparação entre ratos CCI tratados com veículo e Vit. D<sub>3</sub> revelou que a administração da vitamina proporcionou recuperação de aproximadamente 10%, 17%, 21% e 15% no IFI nos dias 4, 15, 22 e 29 após a CCI, respectivamente. Nos ratos CCI tratados com veículo por 28 dias, a recuperação no IFI foi de apenas 11% comparado aos valores obtido no dia 4.

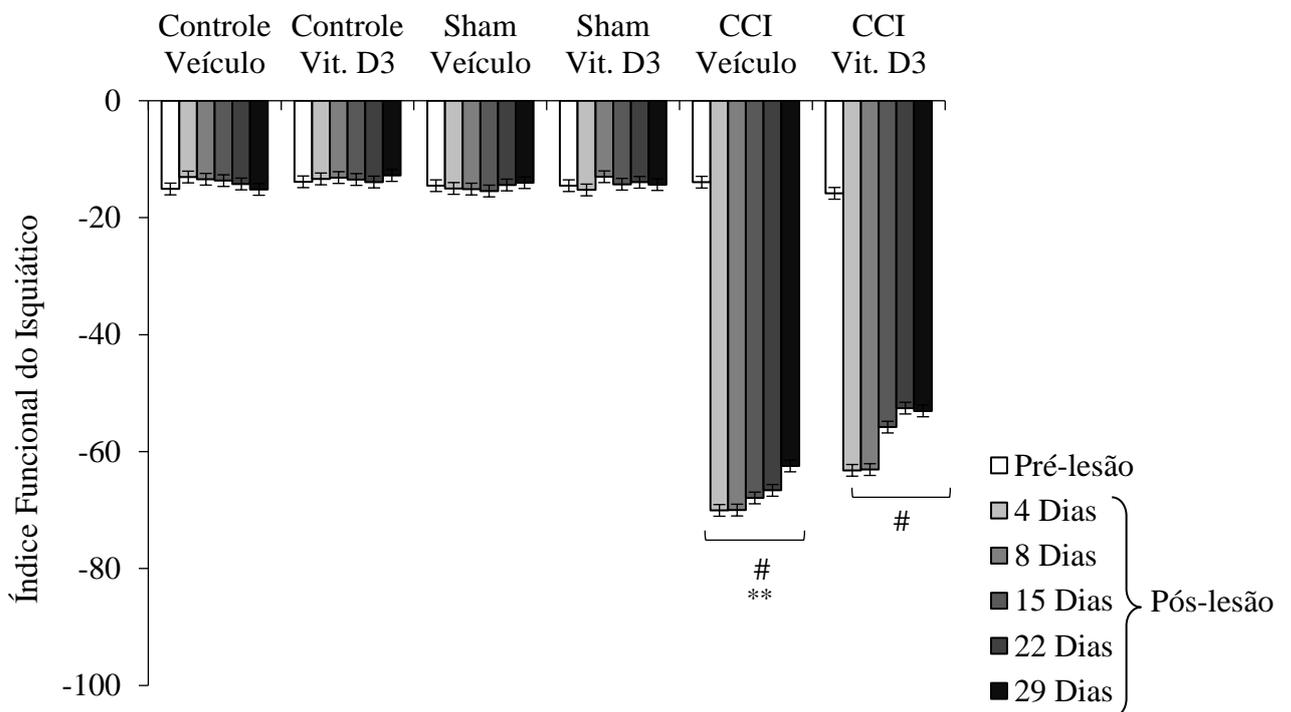


Figura 12: Índice funcional do isquiático em ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. O IFI foi determinado antes da cirurgia (pré-lesão) e aos 4, 8, 15, 22 e 29 dias após a CCI. Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). #P<0,05 comparado a ratos controle e sham. \*\*P<0,05 comparado a ratos CCI tratados com vitamina do mesmo período experimental (ANOVA de medidas repetidas seguido de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

## 5.4 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

### 5.4.1 Pró-oxidante

Na análise estatística dos resultados dos hidroperóxidos lipídicos do nervo isquiático lesionado, a ANOVA revelou diferença significativa entre tratamento ( $p=0,018$ ), mas não grupo ( $p=0,087$ ). Não houve interação significativa entre os fatores grupo e tratamento ( $F_{2,53} = 0,287$ ,  $p = 0,754$ ). O pós-teste mostrou que os hidroperóxidos lipídicos aumentaram significativamente apenas no nervo isquiático lesionado de ratos CCI que receberam administrações de veículo por 7 dias, comparado aos animais CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub> durante o mesmo período de tempo (Figura 13). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos hidroperóxidos lipídicos em nervo isquiático lesionado de ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub> por 7 e 28 dias.

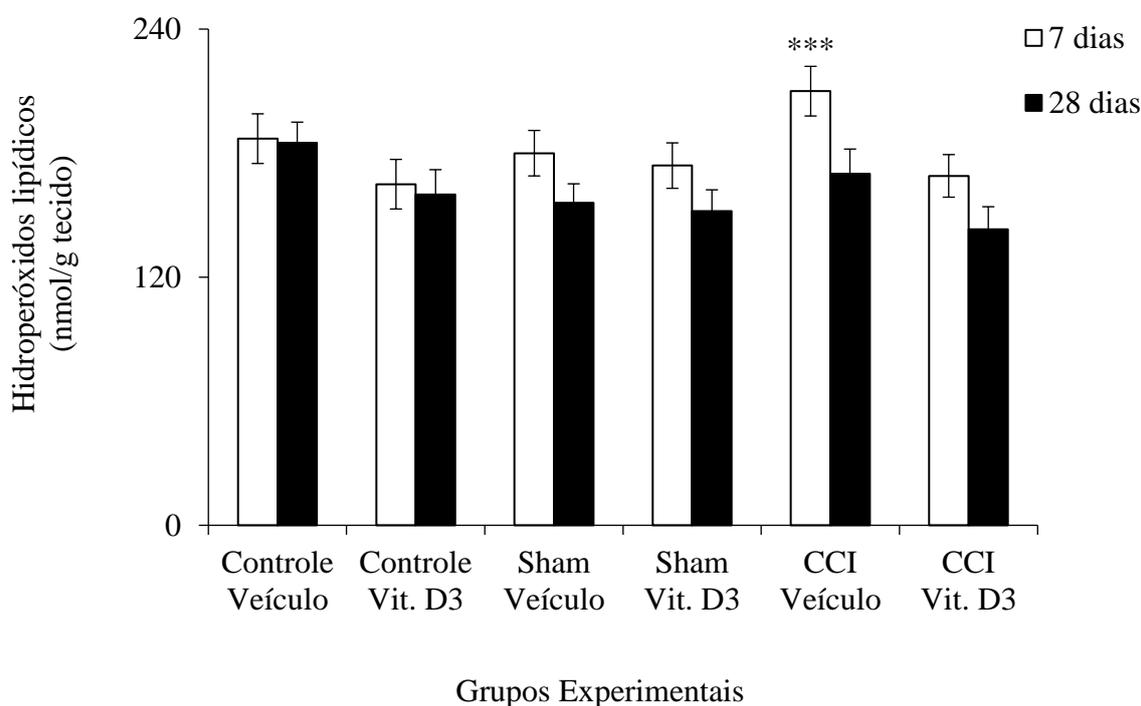


Figura 13: Valores de hidroperóxidos lipídicos em nervo isquiático lesionado de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). \*\*\*P<0,05 comparado a ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub> do mesmo período experimental (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

Na análise dos resultados dos hidroperóxidos lipídicos no segmento lombossacral da medula espinal, a ANOVA de duas vias indicou diferença significativa entre grupo ( $p=0.004$ ), mas não tratamento ( $F_{2,53} = 1,835$ ,  $p=0,180$ ). O pós-teste revelou que os hidroperóxidos lipídicos estavam aumentados apenas em medula espinal de ratos CCI que receberam veículo por 28 dias, comparado ao grupo controle. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos hidroperóxidos lipídicos da medula espinal de ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub> (Figura 14).

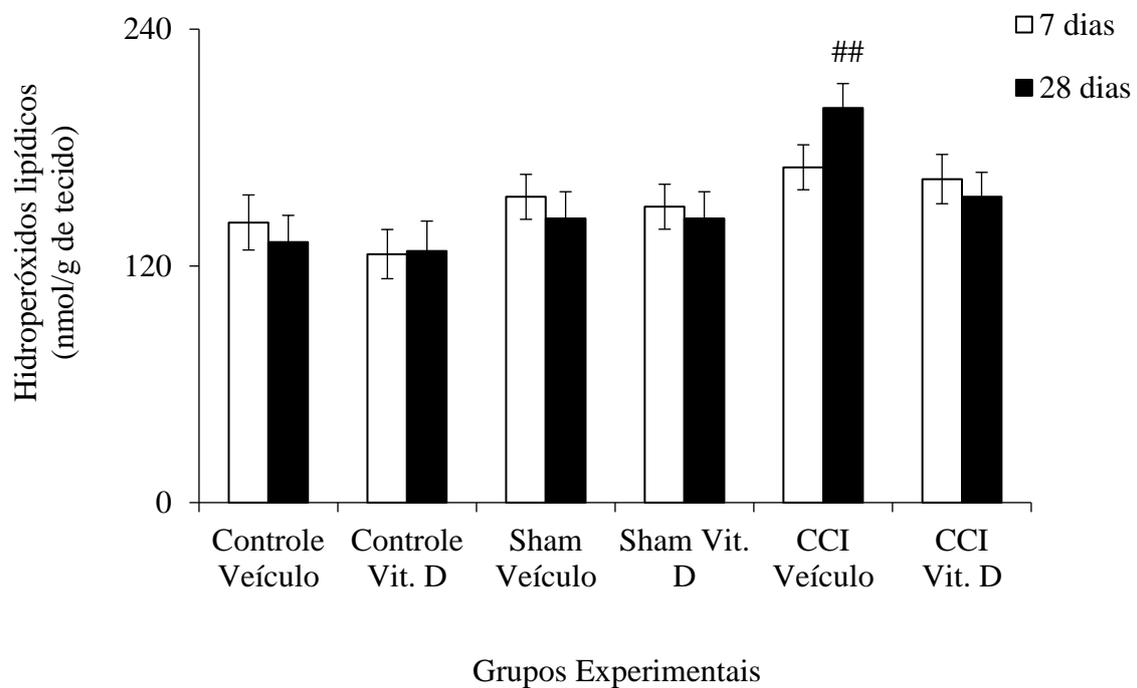


Figura 14: Valores de hidroperóxidos lipídicos em segmento lombossacral da medula espinal de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). <sup>##</sup>P<0,05 comparado a ratos controle (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

Na SAG, a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa entre grupo ( $p > 0,001$ ) e tratamento ( $p > 0,001$ ). Também houve interação significativa entre os fatores grupo e tratamento ( $F_{2,53} = 19,756$ ,  $p < 0,001$ ). O pós-teste revelou que a SAG aumentou significativamente na medula espinal de ratos CCI que receberam veículo por 7 e 28 dias, comparado aos grupos controle e sham (Figura 15). Na medula espinal de ratos com CCI tratados com vitamina D<sub>3</sub>, a SAG estava significativamente aumentada apenas no dia 7, comparado aos valores obtidos em ratos controle. Aos 28 dias, não se observou alterações estatisticamente significativas na SAG em medula espinal de ratos com CCI que receberam administrações de vitamina D<sub>3</sub>. Aos 7 dias após a CCI, a análise de correlação revelou correlação negativa significativa entre SAG e valores do teste de von Frey (ratos CCI tratados com veículo:  $r = -0,832$ ,  $P = 0,0008$ ; ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub>:  $r = -0,659$ ,  $P = 0,0382$ ). Não houve diferenças estatisticamente significativas na SAG na medula espinal de ratos controle e sham.

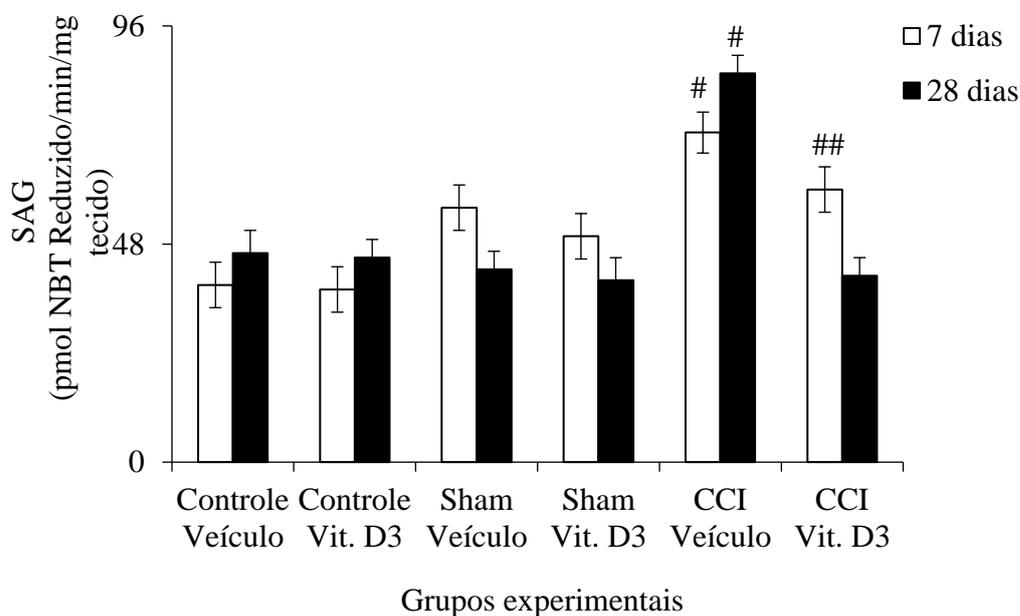


Figura 15: Geração de ânion superóxido (SAG) em segmento lombossacral da medula espinal de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). <sup>#</sup>P<0,05 comparado a ratos controle e sham. <sup>##</sup>P<0,05 comparado a ratos controle (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

Na análise dos resultados do  $H_2O_2$ , a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa entre grupo ( $p < 0,001$ ) e tratamento ( $p < 0,001$ ). Também houve interação significativa entre os fatores grupo e tratamento ( $F_{2,53} = 16,761$ ,  $p < 0,001$ ). O pós-teste revelou que o  $H_2O_2$  aumentou significativamente na medula espinal de ratos CCI que receberam veículo por 7 e 28 dias, comparado aos grupos controle e sham (Figura 16). Na medula espinal de ratos com CCI tratados com vitamina  $D_3$ , o  $H_2O_2$  estava significativamente aumentado apenas no dia 7, comparado aos valores obtidos em ratos controle e sham. Aos 28 dias, não se observou alterações estatisticamente significativas no  $H_2O_2$  em medula espinal de ratos com CCI que receberam administrações de vitamina  $D_3$ . Aos 7 dias após a CCI, a análise de correlação revelou correlação negativa significativa entre  $H_2O_2$  e valores do teste de von Frey (ratos CCI tratados com veículo:  $r = -0,928$ ,  $P = 0,000109$ ; ratos CCI tratados com Vit.  $D_3$ :  $r = -0,632$ ,  $P = 0,05$ ). Não houve diferenças estatisticamente significativas na SAG na medula espinal de ratos controle e sham.

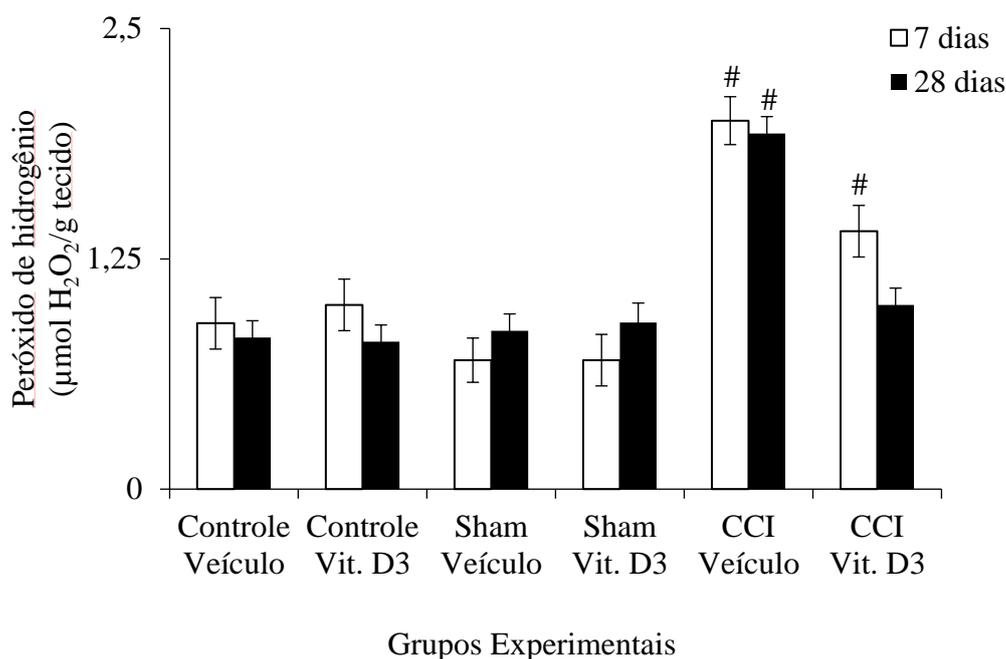


Figura 16: Valores de peróxido de hidrogênio em segmento lombossacral da medula espinal de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina  $D_3$  (Vit.  $D_3$ ) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. Os dados são mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$  ratos/grupo).  $\#P < 0,05$  comparado a ratos controle e sham (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

### 5.4.2 Antioxidante

A TAC não variou significativamente no nervo isquiático lesionado, tanto em ratos CCI que receberam administrações de veículo como naqueles tratados com Vit. D<sub>3</sub>, comparado aos grupos controle e sham ( $F_{2,53} = 1,080$ ,  $p > 0.359$ ) (Figura 17).

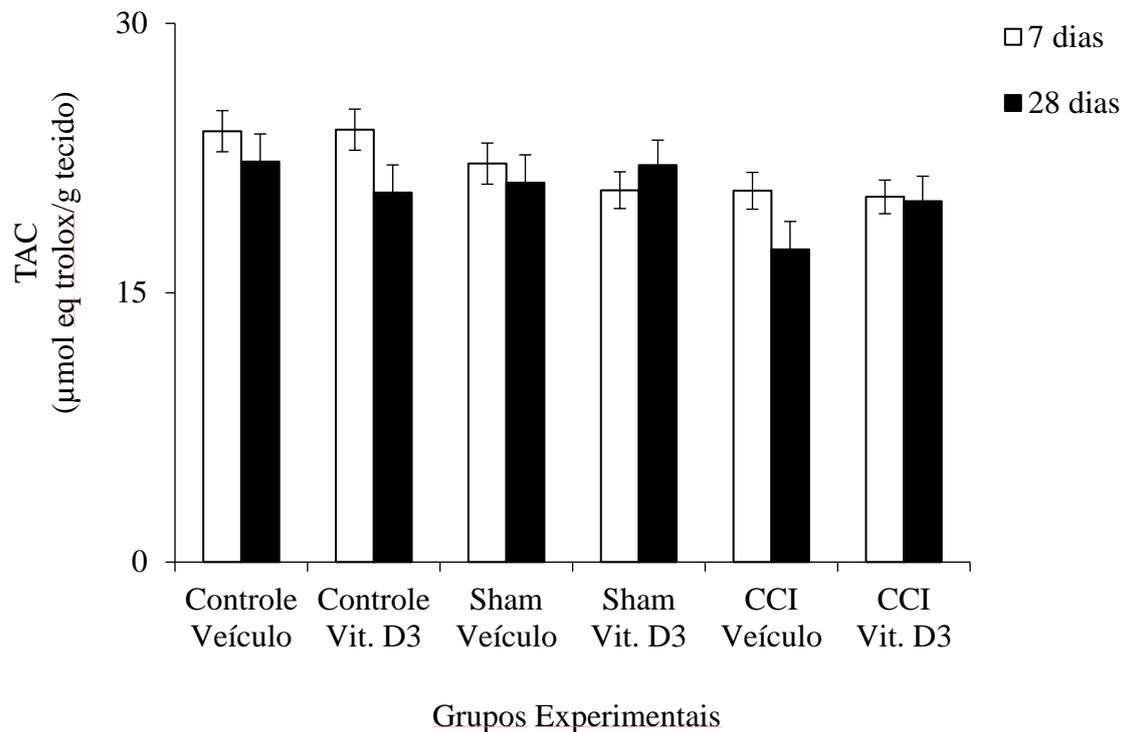


Figura 17: Capacidade antioxidante total (TAC) em nervo isquiático lesionado de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

Na análise dos dados do segmento lombossacral da medula espinal, o tratamento provocou efeito significativo ( $p < 0.007$ ) na TAC (Figura 18). A ANOVA revelou interação significativa entre os fatores grupo e tratamento ( $F_{2,53} = 4,689$ ,  $p < 0,019$ ). O pós-teste mostrou que a TAC aumentou significativamente na medula espinal de ratos CCI que receberam administrações de veículo por 28 dias, comparado aos valores obtidos em ratos CCI tratados pelo mesmo período com veículo. Porém, não houve alteração significativa quando os valores da TAC de ratos CCI tratados com vitamina foram comparados àqueles obtidos em ratos controle e sham. Nenhuma alteração significativa foi observada na TAC da medula espinal de ratos CCI tratados com veículo, e ratos controle e sham.

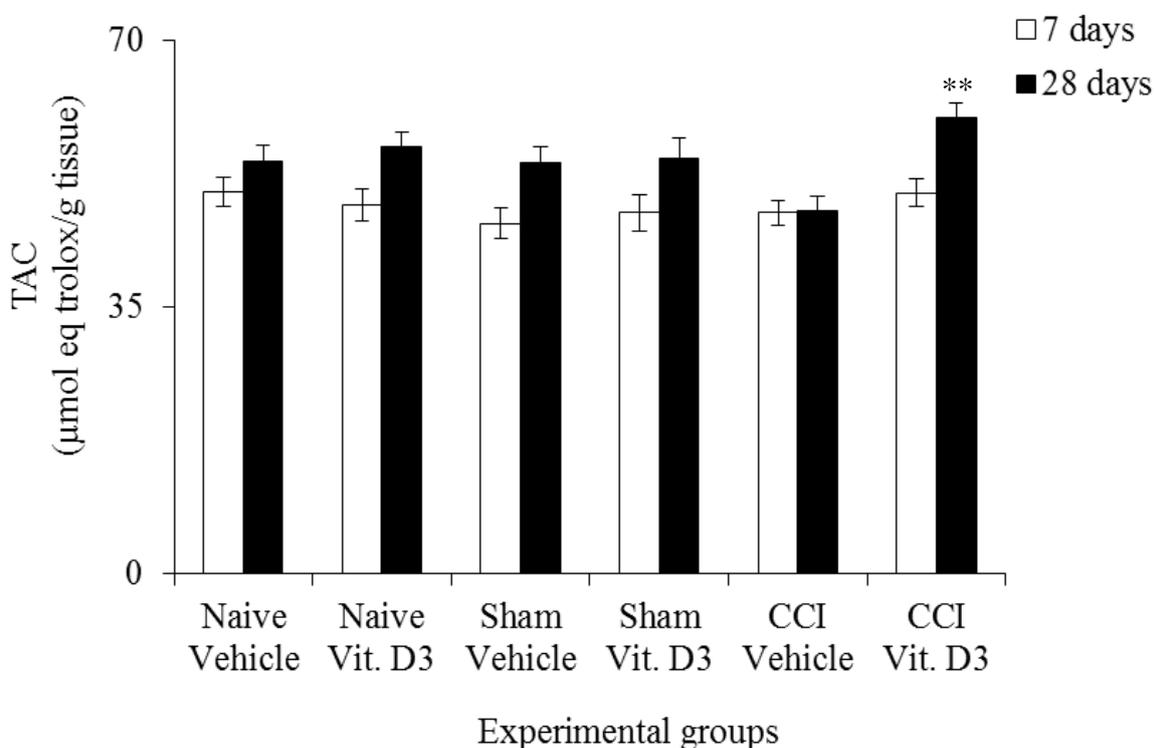


Figura 18: Capacidade antioxidante total (TAC) em segmento lombossacral da medula espinal (de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por gavagem, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). \*\*P<0,05 comparado a ratos CCI tratados com veículo do mesmo período experimental (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

Na análise estatística dos dados de tióis totais da medula espinal, a ANOVA mostrou diferença significativa entre grupo ( $p < 0,001$ ), mas não entre tratamento ( $p = 0,307$ ). Uma interação significativa foi encontrada entre os fatores grupo e tratamento ( $F_{2,53} = 7,891$ ,  $p = 0,003$ ). O pós-teste revelou que o conteúdo de tióis totais diminuiu significativamente na medula espinal de ratos CCI tratados com veículo (Figura 19). Nos ratos que receberam veículo, a diminuição nos tióis totais foi de aproximadamente 29% e 32% após 7 e 28 dias de tratamento, respectivamente. A percentagem de redução nos tióis totais foi em torno de 20% na medula espinal dos ratos CCI que receberam administrações de Vit. D<sub>3</sub> por 7 dias. Porém, não se observou alterações significativas no conteúdo de tióis totais aos 28 dias, sendo o valor encontrado similar àquele obtido na medula espinal de ratos controle e sham. Assim, enquanto o tratamento com Vit. D<sub>3</sub> preveniu por aproximadamente 12% a redução do conteúdo de tióis totais da medula espinal de ratos CCI aos 7 dias, esse efeito foi completo aos 28 dias, comparado ao grupo CCI tratado com veículo. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos tióis totais da medula espinal de ratos controle e sham.

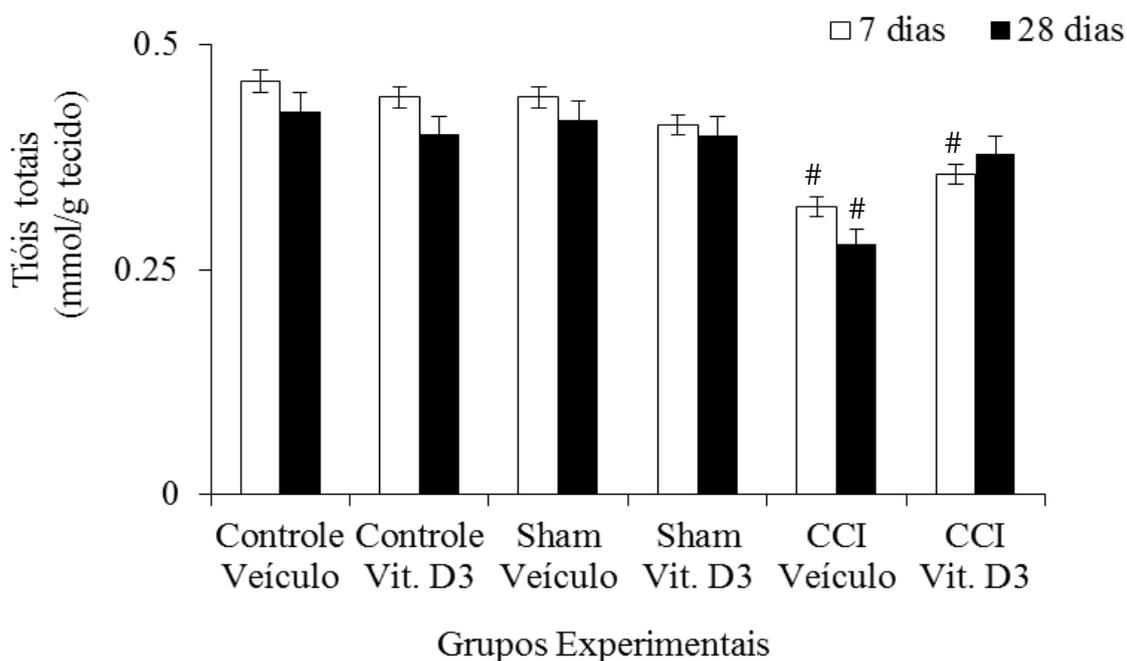


Figura 19: Valores de tióis totais em segmento lombossacral da medula espinal de ratos sem (Controle) e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI), que receberam diariamente, por *gavage*, vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 7 ou 28 dias após o primeiro dia da cirurgia. Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). #P<0,05 comparado a ratos controle e sham (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

## 5.5 INDICADORES DE FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL

Os indicadores plasmáticos de função hepática (AST, TGP e bilirrubina direta) e de função renal (creatinina) não modificaram significativamente após a administração de Vit. D<sub>3</sub> por 28 dias. Os valores foram similares entre ratos tratados com vitamina e veículo (Tabela 1), o que sugere ausência de toxicidade do tratamento por este intervalo de tempo.

**Tabela 1:** Efeito da administração oral de vitamina D<sub>3</sub> (Vit. D<sub>3</sub>) por 28 dias sobre parâmetros plasmáticos em ratos sem qualquer manipulação cirúrgica.

	Veículo	Vit. D <sub>3</sub>
AST (U/L)	175,4±9,86	163,5±13,40
ALT (U/L)	43,7±7,00	36,9±11,20
Bilirrubina direta (mg/dl)	0,81±0,08	0,74±0,06
Creatinina (mg/dl)	0,74±0,10	0,61±0,06

Os valores estão expressos como média±erro padrão da média. AST (aspartato amino transferase), ALT (alanina amino transferase). Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).

## 5.6 Peso corporal

Os ratos do presente estudo foram alimentados *ad libitum*. Assim, os ratos continuaram a crescer e ganhar peso durante o período experimental. A ANOVA mostrou diferença significativa no peso corporal nos dias 21 e 28 comparado a valores obtidos antes da cirurgia e aos 7 e 14 dias após a lesão nervosa periférica ( $F_{2,53} = 140,058$ ,  $p < 0,001$ ). Porém, não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal de ratos tratados com Vit. D<sub>3</sub> comparado a animais que receberam veículo (Figura 20).

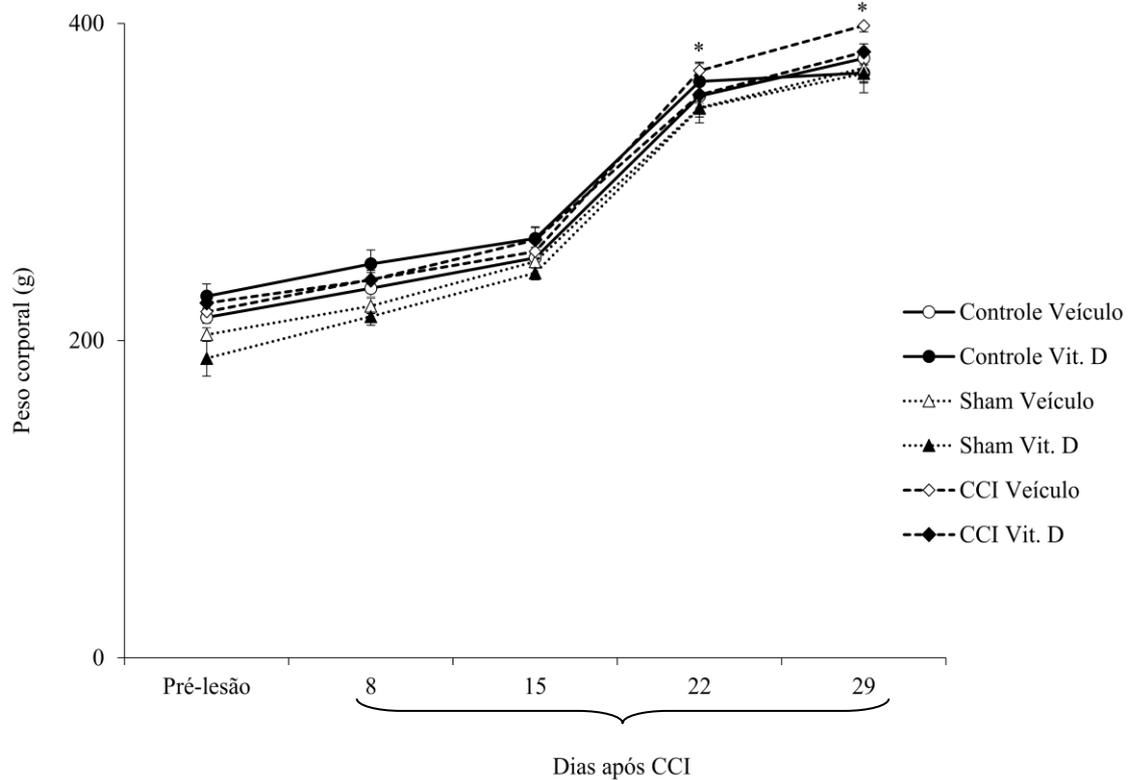


Figura 20. Peso corporal de ratos que receberam vitamina D<sub>3</sub> (500 UI/kg/dia) ou veículo (azeite de oliva) por 28 dias após constrição crônica no nervo isquiático direito (CCI). Os dados são mostrados como média ± erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). \*P<0,05 comparado a valores obtidos antes da lesão nervosa e aos 7 e 14 dias após a CCI (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey). Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição.

---

## 6. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito da Vit. D<sub>3</sub>, administrada por *gavage* na dose de 500 UI/kg/dia, sobre parâmetros nociceptivos, como sensibilidades mecânica e térmica, e recuperação funcional do nervo isquiático lesionado, mediante determinação do IFI, em ratos submetidos a CCI, um modelo de dor neuropática amplamente usado na literatura. Com o intuito de analisar se a administração da vitamina por 28 dias poderia induzir toxicidade ou dano no organismo, foi mensurado indicadores de função hepática e renal, como ALT, AST, bilirrubina direta e creatinina no plasma. Paralelamente se determinou o efeito da administração da vitamina sobre os valores de hidroperóxidos lipídicos e da TAC em nervo isquiático lesionado, e formação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxidos lipídicos, tióis totais e TAC no segmento lombossacral da medula espinal dos ratos.

Antes da discussão dos resultados obtidos no estudo, merecem destaque algumas considerações sobre a Vit. D. Essa vitamina é um hormônio esteroide, o qual desempenha papel importante na regulação da concentração plasmática de cálcio. É sabido que o aumento na concentração plasmática de Vit. D provoca acréscimo no cálcio livre (HUR et al., 2014; SLOMINSKI et al., 2010). Sendo assim, poderia se pensar que a administração da Vit. D<sub>3</sub> provocou alterações na homeostase corporal do cálcio livre. Foi demonstrado que a suplementação com Vit. D<sub>3</sub>, administrada por via intraperitoneal na dose de 2 µg/kg, aumentou significativamente a concentração sérica de cálcio livre, tanto em camundongos quanto em ratos (CHEN et al., 2014; WANG et al., 2012; SLOMINSKI et al., 2010). Porém, sabe-se que a rota de administração de Vit. D influencia em sua concentração plasmática. A quantidade de Vit. D<sub>3</sub> na circulação diferiu se a administração foi por via intraperitoneal ou oral (VIETH et al., 1990). Segundo estes autores, a administração por vias oral e intraperitoneal de dose única de Vit. D<sub>3</sub> provocou a mesma alteração em sua concentração plasmática. Porém, quando foram feitas administrações repetidas de doses suprafisiológicas de Vit. D<sub>3</sub> houve diferenças dependentes da rota de administração. A rota intraperitoneal induziu aumento significativo na concentração plasmática de Vit. D<sub>3</sub>, porém, quando a administração se fez por via oral, uma quantidade menor dessa vitamina foi encontrada na circulação. Nessa última condição houve efeito menor da Vit. D<sub>3</sub> sobre a concentração plasmática de cálcio livre (VIETH et al., 1990). Posteriormente se observou que não ocorreu hipercalcemia em ratos que receberam Vit. D, em doses de 0,015, 0,25 e 3,75 mg/dia durante 4 semanas (MIRHOSSEINI et al., 2016). Também não houve alteração na concentração

plasmática de cálcio livre em ratos que receberam 500 UI/kg/dia de Vit. D<sub>3</sub> durante 12 semanas (CHABAS et., 2013). Assim, embora o presente estudo não tenha avaliado a concentração plasmática de cálcio livre, se pode sugerir que os ratos tratados com Vit. D<sub>3</sub>, na concentração de 500 UI/kg/dia por 7 e 28 dias, não tiveram variações grandes na homeostase do cálcio livre plasmático. Porém, torna-se necessário determinar os valores de íon cálcio no plasma de ratos tratados com Vit. D<sub>3</sub>, na dose de 500 UI/kg/dia por 7 e 28 dias, para comprovação da ausência de hipercalemia no plasma dos ratos.

O modelo de dor neuropática usado no presente estudo reproduziu os sintomas clássicos de diminuição nos limiares mecânico e térmico, e IFI, após a CCI, como mostrado em estudos anteriores (SCHEID et al., 2018; HORST et al., 2017; RIFFEL et al., 2020, 2018; 2016; SANTOS et al., 2014; HORST et al., 2014). A administração de Vit. D<sub>3</sub> atenuou a redução nos limiares, o que sugere que o tratamento induziu efeito antinociceptivo nos ratos CCI que receberam administração de vitamina, tanto por 7 como 28 dias. Um estudo recente também relatou antinocicepção em ratos CCI que receberam administrações intraperitoneais de Vit. D<sub>3</sub> (BANAFSHE et al., 2018). Segundo esses autores, os ratos da linhagem Sprague-Dawley submetidos a CCI, e que receberam Vit. D<sub>3</sub> por via intraperitoneal desde o primeiro dia após a cirurgia até o 21º dia pós-operatório, nas doses de 250, 500 e 1000 UI/kg, exibiram atenuação em sua resposta a estímulo frio; houve queda também na hiperalgesia ao calor. Porém, os autores não observaram mudança significativa no limiar mecânico (BANAFSHE et al., 2018). Esse resultado diferiu do que foi encontrado no presente estudo, no qual a administração de Vit. D<sub>3</sub> já provocou atenuação no limiar mecânico após 3 dias de tratamento. No momento é impossível explicar a diferença entre os estudos. Todavia, as linhagens de ratos usadas devem ser consideradas como possível contribuidor às diferenças. Foi demonstrado que ratos de diferentes linhagens exibem comportamentos frente a estímulos dolorosos que diferem entre si (YOON et al., 1999).

A Vit. D<sub>3</sub> também atenuou a redução no IFI em ratos CCI que receberam esse tratamento. Uma atenuação também foi encontrada no índice funcional fibular (também denominado índice funcional peroneal) em ratos submetidos à secção e autoenxerto invertido do nervo fibular (também chamado nervo peroneal), os quais receberam por via oral Vit. D<sub>3</sub> por 12 semanas (CHABAS et al., 2013). Segundo esses autores, a recuperação completa na atividade elétrica do tecido, e a obtenção de valores do índice funcional fibular similar àqueles de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica, só ocorreu no terceiro mês após a lesão nervosa periférica. É possível que um período similar seja necessário para o retorno do IFI a valores próximos a zero, indicador de normalidade de função no nervo. Assim, pode-se sugerir que

mais tempo seja necessário para a recuperação completa do IFI nos ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub>.

Foi sugerido que as deformidades no padrão de caminhada de ratos, induzidas pela CCI, provavelmente se relacionam mais à dor espontânea em curso do que a alodinia mecânica (NAKAZATO-IMASATO & KUREBAYASHI, 2009). Sendo assim, pode-se sugerir que o maior acréscimo no IFI se relaciona a atenuação da dor espontânea em curso nos ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub>. É sabido que a cascata neuroinflamatória, caracterizada por infiltração de leucócitos, ativação de células da glia, e liberação de mediadores pró-inflamatórios é uma importante característica na dor neuropática (FERNANDES et al., 2017). Recentemente se observou que a administração intraperitoneal de 25-hidroxivitamina D [25(OH)Vit. D], por 8 semanas, provocou queda significativa em fatores pró-inflamatórios, enquanto aumentou significativamente moléculas com ação antiinflamatória (HAN et al., 2019). Foi demonstrado ainda que a Vit. D<sub>3</sub> induziu atenuação na formação de moléculas com ação inflamatória em cultura de neurônios-glia (HUANG et al., 2015). É sabido que a redução em processos inflamatórios contribui para a antinocicepção em ratos com CCI (CÂMARA et al., 2013). Assim, pode-se sugerir que a ação antiinflamatória da Vit. D contribuiu para a antinocicepção mostrada no presente estudo e, assim, para a atenuação no IFI. Porém, é possível que outros mecanismos também estejam desempenhando papel importante na atenuação do IFI em ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub>. Foi demonstrado que essa vitamina modificou a expressão de genes envolvidos no processo de axogênese e mielinização (CHABAS et al., 2013). Segundo esses autores, o tratamento com vitamina D<sub>3</sub> provocou: aumento no número de axônios preservados ou recém-formados na extremidade proximal do nervo lesionado; acréscimo no diâmetro médio do axônio em sua extremidade distal; e maior número de neuritos mielinizados nas extremidades distal e proximal do nervo. Assim, essas ações da Vit. D<sub>3</sub> pode também estar contribuindo para a atenuação no IFI.

Outro foco do presente estudo foram as ROS por seu envolvimento nos mecanismos de dor, incluindo a dor neuropática (BITTAR et al., 2017; GRACE et al., 2016; SALVEMINI et al., 2011). Em concordância com dados da literatura (RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018; HORST ET AL., 2017a; b; NAIK et al., 2006), os resultados do presente estudo mostraram acréscimo nos valores de hidroperóxidos lipídicos em nervo isquiático lesionado e segmento lombossacral da medula espinal de ratos CCI que receberam veículo e, ainda, aumentos na SAG e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na medula espinal desses ratos. Assim, pode-se sugerir que o modelo experimental de dor neuropática usado no presente estudo reproduziu as alterações características em parâmetros de estresse oxidativo no tecido nervoso dos ratos CCI. Nesse

modelo se mostrou, pela primeira vez, que a administração oral de Vit. D<sub>3</sub> foi capaz de prevenir as alterações nos marcadores pró-oxidantes, tanto em nervo isquiático lesionado como em medula espinal. Como a queda nos valores de SAG e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram encontrados na medula espinal dos mesmos ratos que exibiram atenuação nos limiares mecânico e térmico e no IFI, uma relação entre esses fatores não pode ser descartada. De fato, foi demonstrada atenuação na nocicepção e IFI em ratos com CCI que exibiram queda em marcadores de estresse oxidativo no nervo isquiático lesionado e medula espinal após a administração de substâncias com ação antioxidante (RIFFEL et al., 2018; 2016; SCHEID et al., 2018; HORST ET AL., 2017a; b). Ainda, a deficiência na enzima NOX4, envolvida na formação de ROS, provocou diminuição na regulação para cima de citocinas pró-inflamatórias no local da lesão nervosa e uma atenuação na hiperssensibilidade mecânica induzida pela CCI (GEIS et al., 2017). A Vit. D parece regular para baixo a NOX, enzimas geradoras de ROS, mas regula para cima a enzima antioxidante superóxido dismutase (BERRIDGE, 2015). A Vit. D também regula para cima a enzima antioxidante glutaciona peroxidase (BERRIDGE, 2015; 2016). A superóxido dismutase é a enzima que converte superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e a glutaciona peroxidase catalisa a quebra de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (POLJSAK et al., 2013). Assim, a diminuição na SAG e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na medula espinal de ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub> pode estar relacionada às ações dessa vitamina sobre as enzimas NOX, superóxido dismutase e glutaciona peroxidase. Infelizmente o presente estudo não avaliou a atividade dessas enzimas. Essa questão será abordada em estudos futuros do grupo de pesquisa.

Os efeitos antioxidantes da Vit. D<sub>3</sub> também podem estar relacionados à manutenção do conteúdo de tióis totais na medula espinal de ratos com CCI que receberam essa vitamina. Foi demonstrado que a Vit. D regula a expressão das enzimas  $\gamma$ -glutamiltranspeptidase, glutamato cisteína ligase e glutaciona redutase, as quais desempenham papel importante na síntese de glutaciona (BERRIDGE, 2017). Segundo este autor, a Vit. D também aumenta a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, o que também contribui para acréscimos na formação de glutaciona. A glutaciona é o tiol mais abundante em mamíferos (POOLE, 2015). Assim, todos esses mecanismos devem estar contribuindo para a ausência de queda nos valores de tióis totais na medula espinal de ratos com CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub>. A redução no conteúdo de tióis totais na medula espinal de ratos CCI que receberam veículo está de acordo com dados da literatura (RIFFEL et al., 2018).

Considerando as ações da Vit. D diminuindo SAG e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e prevenindo diminuição no conteúdo de tióis totais, pode-se sugerir que estes efeitos contribuíram para a falta de alterações significativas nos hidroperóxidos lipídicos em nervo isquiático lesionado e medula

espinal de ratos CCI que receberam administrações dessa vitamina. É sabido que no SNC o dano a lipídios é um evento muito comum causado por ROS devido a grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes nesse tecido (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010). Além disso, a glutatona é um agente protetor e reduz ROS (ROBACZEWSKA et al., 2016).

Interessantemente, a TAC não alterou significativamente em nervo isquiático lesionado e medula espinal de ratos CCI que receberam veículo por 7 e 28 dias e naqueles tratados com Vit. D<sub>3</sub> por 7 dias. A medida da TAC avalia a presença de compostos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos no tecido, tais como superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona (SAHIN et al., 2014). Os tióis parecem ser o principal determinante da TAC em tecidos homogeneizados (BALCERCZYK et al., 2003). Em nervo isquiático, foi observado que a CCI provocou aumento na peroxidação de lipídeos, diminuiu os valores de glutatona, aumentou a atividade da superóxido dismutase, sem alterar significativamente a atividade da enzima antioxidante catalase (NAIK et al., 2006). Em medula espinal, a glutatona e a atividade das enzimas glutatona peroxidase e glutatona transferase diminuíram, enquanto a atividade da superóxido dismutase aumentou, e nenhuma alteração significativa ocorreu na atividade da catalase após a CCI (SCHEID et al., 2018). Assim, é possível que as alterações inter-relacionadas em pró-oxidantes e antioxidantes podem estar contribuindo para a falta de alterações significativas na TAC do nervo e da medula espinal dos ratos CCI. A determinação da atividade de enzimas antioxidantes, como foi previamente sugerido, trará contribuição significativa para melhor entendimento da relação entre CCI, TAC e Vit. D<sub>3</sub>.

Interessantemente, a TAC aumentou na medula espinal de ratos CCI que receberam Vit. D<sub>3</sub> por 28 dias, mas esse efeito só foi observado quando se fez a comparação dos valores da TAC de ratos CCI que receberam vitamina àqueles obtidos em ratos CCI tratados com veículo por igual período. Nenhuma mudança significativa foi encontrada na comparação dos dados da TAC de ratos CCI tratados com vitamina e ratos controle. O acréscimo na TAC provavelmente se relaciona às ações antioxidantes da vitamina D, como previamente discutido. A falta de mudanças significativas na comparação entre ratos CCI tratados com Vit. D<sub>3</sub> e ratos controle sugere que a administração dessa vitamina não foi capaz de provocar alterações nas redes bem integradas dos sistemas de defesa antioxidante onde a Vit. D poderia interferir. Todavia, é preciso cautela nessa interpretação. Isso se deve ao fato do presente estudo possuir algumas limitações. Neste estudo não foram avaliadas as concentrações plasmáticas de 25(OH)Vit. D, a principal forma circulante de Vit. D e a forma geralmente

usada para monitorar o *status* dessa vitamina (TUCKEY et al., 2019). Foi demonstrado que fatores como tipo e quantidade de fibra alimentar, *status* da Vit. D, e variações genéticas em proteínas envolvidas na absorção intestinal dessa vitamina são fatores com capacidade para provocar alterações na biodisponibilidade da Vit. D (BOREL et al., 2015). Além disso, sabe-se que a resistência na circulação arterial e a pressão sistólica do sangue exibem curva dose-resposta em forma de U após tratamento com Vit. D, com os valores mais baixos (bom funcionamento do sistema cardiovascular) ocorrendo quando a concentração plasmática de 25(OH)Vit. D foram 43 nmol/L em ratos Wistar sem qualquer manipulação cirúrgica (MIRHOSSEINI et al., 2016). Segundo esses autores, a concentração plasmática de 25(OH)Vit. D foi 108 nmol/L em ratos que receberam diariamente Vit. D em dose equivalente a 5,45 µg/dia. Nesses ratos houve aumento de 10 mmHg (não significativo) na pressão sistólica do sangue, o que não ocorreu na pressão diastólica (MIRHOSSEINI et al., 2016). Como o presente estudo utilizou Vit. D<sub>3</sub> na dose de 500 UI/dia (equivalente a 12,5 µg/dia), pode-se sugerir que a concentração plasmática de 25(OH)Vit. D foi superior a 108 nmol/dia. Assim, não se pode descartar a possibilidade de mudanças em parâmetros do sistema cardiovascular nos ratos tratados com Vit. D<sub>3</sub>.

Outra limitação do presente estudo é que não se avaliou o efeito de uma dose intermediária de Vit. D<sub>3</sub> em nosso modelo animal. No entanto, nenhuma evidência de toxicidade foi observada nos ratos que receberam Vit. D<sub>3</sub>, embora tenham sido avaliados apenas os indicadores plasmáticos ALT, AST, bilirrubina direta e creatinina. Todavia, os ratos usados na pesquisa não mostraram alterações comportamentais durante o período de observação. Além disso, nenhuma morte ocorreu e nenhuma mudança significativa foi encontrada no peso corporal. A falta de alterações nesses parâmetros está de acordo com um estudo anterior, onde foram usados ratos que receberam semanalmente Vit. D<sub>3</sub> na dose de 500 UI/kg/dia (CHABAS et al., 2013).

Apesar de possuir limitações, o presente estudo é o primeiro a mostrar a relação entre tratamento com Vit. D<sub>3</sub> e marcadores pró-oxidante e antioxidante em nervo isquiático lesionado e medula espinal, sendo essa última o principal local de ação de ROS na dor neuropática (KIM et al., 2015). Embora sejam necessários mais estudos para melhor entendimento da relação entre Vit. D<sub>3</sub> e ROS no tecido nervoso em condição de dor neuropática, a ação dessa vitamina nos parâmetros de estresse oxidativo aqui demonstrados precisa ser considerada ao avaliar a analgesia induzida por Vit. D.

Merece também ser considerada a falta de efeito do veículo sobre os parâmetros analisados no estudo. Em uma revisão recente sobre dor crônica e constituinte da dieta com

ação antiinflamatória e antioxidante, recomendou-se o consumo diário de azeite de oliva extra virgem e, semanalmente, de azeitonas para pacientes com dor crônica (RONDANELLI et al., 2018). Segundo esses autores, os componentes presentes no azeite de oliva, como ácidos graxos monoinsaturados e polifenóis, teriam papel importante no manejo da dor crônica devido às suas ações antiinflamatória, antimicrobiana e antioxidante. A falta de efeito do veículo nos ratos CCI tratados com veículo sugere que o azeite de oliva, na dose usada no presente estudo e administrada por 28 dias, não proporcionou efeito benéfico na nocicepção induzida por CCI, e não modificou o *status* oxidativo induzido pela dor no tecido nervoso. Todavia, é preciso cautela nessa interpretação. No estudo não foi avaliada a composição do azeite de oliva. Ainda, não foi avaliado o efeito de um tempo maior de administração de azeite de oliva em ratos com CCI. Assim, é necessária a realização de estudos complementares para melhor entendimento do efeito da ingestão de azeite de oliva na dor neuropática.

Cabe ainda destacar o aumento na sensibilidade mecânica nos ratos com lesão *sham* que receberam administração de veículo e vitamina D<sub>3</sub> por 4 e 8 dias após a cirurgia. Provavelmente esse resultado seja consequência da incisão nos tecidos cutâneo e muscular. Sabe-se que a lesão tecidual provoca liberação de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e outros mediadores, ocasionando maior excitabilidade em neurônios aferentes primários e sensibilização periférica, que posteriormente leva a maior excitabilidade em neurônios do corno dorsal da medula espinal, à sensibilização central e ao desenvolvimento de hiperalgesia (MIFFLIN; KERR, 2014). Entretanto, a hiperalgesia decorrente de lesões teciduais em animais *sham* é observada de forma transitória, como relatado em estudos anteriores deste grupo de pesquisa (SCHEID et al, 2018; HORST et al., 2014; GUEDES et al., 2006). Interessantemente, a administração de vitamina D<sub>3</sub>, na dose de 500 UI/kg/dia por 4 e 8 dias não foi capaz de atenuar essa sensibilização. Porém, houve uma variação maior nos dados obtidos nos ratos *sham* nesses intervalos de tempo. Assim, estudos complementares serão realizados para melhor entendimento dos efeitos da administração de Vit. D<sub>3</sub> em ratos *sham*.

---

## 7. CONCLUSÃO

Este estudo reproduziu o efeito antinociceptivo da Vit. D<sub>3</sub> em ratos com CCI. Pela primeira vez se mostrou que a administração de Vit. D<sub>3</sub> induz atenuação no IFI e, em medula espinal, reduz a SAG, os valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos lipídicos, além de prevenir a queda em tióis totais e provocar pouca alteração na TAC desse tecido. Como as ROS desempenham papel importante na dor neuropática (GRACE et al., 2016; SALVEMINI et al., 2011), e o *scavenger* de ROS parece ajudar a normalizar o *status* oxidativo da medula espinal alterado pela dor, os resultados do presente estudo sugerem que alterações em parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal contribuem para o efeito benéfico dessa vitamina em condições de dor neuropática.

---

## 8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, propõe-se avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase em medula espinal de ratos sem e com CCI no nervo isquiático, os quais receberam Vit. D<sub>3</sub> ou veículo por *gavage* durante 7 e 28 dias. Propõe-se também avaliar nesse tecido a expressão de TNF- $\alpha$  e das proteínas p38 e NF $\kappa$ B, determinações que estão em andamento. O TNF- $\alpha$  devido a sua ação pró-inflamatória, e a p38 e o NF $\kappa$ B por estarem envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática.

Propõe-se também finalizar a redação do manuscrito científico referente aos dados do presente estudo, o qual se encontra em fase adiantada de elaboração.

---

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASEMI Z. Effects of vitamin D supplementation on glucose metabolism, lipid concentrations, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial. **The American Journal Of Clinical Nutrition**. Isfahan, p. 1425-1432. dez. 2013.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-145, 2001.

BANAFSHE, Hamid Reza. Vitamin D supplementation attenuates the behavioral scores of neuropathic pain in rats. **Nutritional Neuroscience**. Kashan, p. 700-705. fev. 2018.

BALCERCZYK, A. Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity. **Biofactors**. Łódź, p. 75-82. fev. 2003.

BALIKI M.N., APKARIAN A.V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**. v. 87. p. 474-491, 2015.

BARON R., BINDER A., WASNER G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**. v. 9. p. 807-819, 2010.

BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., SCHERRER, G., JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**. v. 139. p. 267-284, 2009.

BASIT, Abdul. Vitamin D for the treatment of painful diabetic neuropathy. **Bmj Open Diabetes Research And Care**. Karachi, p. 1-6. fev. 2016.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. **Pain**. v. 33, p. 87-107, 1988.

BEYERS, M. R.; BONICA, J. J. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: **Assessment of Pain**. p. 26-27, 2001.

BELLEI, Elisa. Serum protein changes in a rat model of chronic pain show a correlation between animal and humans. **Scientific Reports**. Modena, p. 1-12. fev. 2017.

BERRIDGE, Michael J.. Vitamin D cell signalling in health and disease. **Biochemical And Biophysical Research Communications**. Cambridge, p. 53-71. abr. 2015.

BERRIDGE, Michael J.. Vitamin D, reactive oxygen species and calcium signalling in ageing and disease. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**. Cambridge, p. 1-11. ago. 2016.

BERRIDGE, Michael J.. Vitamin D and Depression: Cellular and Regulatory Mechanisms. **Pharmacological Reviews**. Cambridge, p. 80-92. abr. 2017.

BHAT et al. Effect of ursolic acid in attenuating CCI-induced neuropathic pain in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v.30(6). p.517-528., 2016.

BITTAR, Alice. Reactive oxygen species affect spinal cell type-specific synaptic plasticity in a model of neuropathic pain. **Pain**. Galveston, p. 2137-2146. nov. 2017.

BOREL, P.. Vitamin D Bioavailability: State of the Art. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**. Marseille, p. 1193-1205. mar. 2015.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation, **Methods in Enzymology**. v.52 p.302-310, 1987.

CÂMARA, Carlos. C.. Oral gabapentin treatment accentuates nerve and peripheral inflammatory responses following experimental nerve constriction in Wistar rats. **Neuroscience Letters**. Fortaleza, p. 93-98. nov. 2013.

CAREY E.T., AS-SANIE S. New developments in the pharmacotherapy of neuropathic chronic pelvic pain. **Future Science**. v. 5. p. 148, 2016.

CHABAS, Jean-francois. Cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) improves myelination and recovery after nerve injury. **Plos One**. Marseille, p. 1-15. maio 2013.

CHEN, Q.Y., TAN, C.Y., WANG, Y., MA, K.T., LI, L., SI, J.Q. Mechanism of persistent hyperalgesia in neuropathic pain caused by chronic constriction injury. **Neural Regeneration Research**, v. 14. p.1091-1098. 2019.

CHEN, Jianjun. Novel Vitamin D Analogs as Potential Therapeutics: The Metabolism, Toxicity Profiling, and Antiproliferative Activity. **Anticancer Research**. Memphis, p. 2153-2163. maio 2014.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **Bmj**. v. 348, n. feb05 6, p. f7656–f7656, 2014.

COLLOCA L., LUDMAN T., BOUHASSIRA D., BARON R., DICKENSON A.H., YARNITSKY D., et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 3. n. 17002. p.1-19, 2017.

COLOTTA, Francesco et al. Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. **Journal Of Autoimmunity**. Saluggia, p. 78-97. jul. 2017.

COURTES, Aline Alves. Protective Effects of Aqueous Extract of *Luehea divaricata* against Behavioral and Oxidative Changes Induced by 3-Nitropropionic Acid in Rats. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**. Uruguaiiana, p. 1-11. out. 2015.

DAS V. An introduction to pain pathways and pain “targets”. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. v.131. p. 1-30, 2015.

DELLAROZA, M. S. G. *et al.* Dor crônica em idosos residentes em São Paulo, Brasil: prevalência, características e associação com capacidade funcional e mobilidade (Estudo

SABE). **Cadernos de Saúde Pública**. v. 29, n. 2, p. 325–334, 2013.

DEPINTOR, J. D. P. *et al.* Prevalence of chronic spinal pain and identification of associated factors in a sample of the population of São Paulo, Brazil: cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal** v. 134, n. 5, p. 375–384, 2016.

DROGE W. Free Radicals in the Pshysiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**. v. 82. n. 1. p. 47-95., 2002.

DE OLIVEIRA D. The interfaces between vitamin D, sleep and pain. **Journal Of Endocrinology**. São Paulo, p. 23-36. dez. 2017.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. v. 10, n. September, p. 1–17, 2017.

DUBNER, R. Pain research in animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 75. p. 128-132, 1983.

DWORKIN, R. H. *et al.* Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132, p. 237-251, 2007.

EATON, P., 2006. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. **Free Radical Biology and Medicine**, v.40, n.11, p.1889-1899, 2006.

EREL O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**. v.37(4). p.277-285., 2004.

FERNANDES, V., SHARMA, D., VAIDYA, S., SHANTANU, P. A., GUAN, Y., KALIA, K., TIWARI, V. Cellular and molecular mechanisms driving neuropathic pain: recente advancements and challenges. **Expert Opinions on Therapeutic Targets**, v. 22, n. 2, p. 131-142, 2018.

FINNERUP N. B., NADINE ATTAL M. D. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. **The Lancet Neurology**. v. 14(2). p. 162-173., 2015.

FEIN A. **NOCICEPTORS: The Cells That Sense Pain**. 2011.

FRIDOVICH I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**. v. 20. p. 1203-1209, 1998.

GEIS C., GEUSS E., SOMMER C., SCHMIDT H.H., KLEINSCHNITZ C. NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. **Experimental Neurology**. 288. p. 94-103, 2017.

GRACE P.M., GAUDET A.D., STAIKOPOULOS V., MAIER S.F., HUTCHINSON M.R., SALVEMINI D., WATKINS L.R. Nitroxidative Signaling Mechanisms in Pathological Pain. **Trends in Neurosciences**. v. 39 p. 862-879, 2016.

GUEDES, R. P. et al. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, p. 1049-1056, 2008.

GUEDES, R. P. et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. **Neurochemical Research**, v. 31, p. 603-609, 2006.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**. v. 4. 2007.

HAN, Jing. Vitamin D reduces the serum levels of inflammatory cytokines in rat models of periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease. **Journal Of Oral Science**. Beijing, p. 53-60. fev. 2018.

HEHN, C. A. VON; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. **Neuron**. v. 73, n. 4, p. 638–652, 2012.

HORST, A.. Effects of N-acetylcysteine on spinal cord oxidative stress biomarkers in rats with neuropathic pain. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**. p. 1-7. out. 2017.

HORST A., KOLBERG C., MORAES M.S., FINAMOR I.A., BELLÓ-KLEIN A., PAVANATO M.A., et al. Effect of N-acetylcysteine on the spinal-cord glutathione system and nitric-oxide metabolites in rats with neuropathic pain. **Neuroscience Letters**. v. 569. p. 163-168, 2014.

HUANG, Ya-ni. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxininduced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. **Journal Of Neuroinflammation**. Taipei, p. 1-12. maio 2015.

HUR, Jinyoung. Regulatory Effect of 25-hydroxyvitamin D3 on Nitric Oxide Production in Activated Microglia. **The Korean Journal Of Physiology & Pharmacology**. Seongnam, p. 397-402. out. 2014.

IASP – International Association for the Study of Pain. Subcommittee on taxonomy. Classification of chronic pain. Description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**. v. 3. p. 1-226, 2008.

JAGGI A.S., JAIN V., SINGH N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 25. p. 1-28, 2011.

JIANG, Z.Y. WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v.26 p.853-856, 1991.

KALLENBORN-GERHARDT et al. NOXious signaling in pain processing. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 137(3). p. 309-317., 2013.

KAVALIERS, M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. **Brain Research**.v. 21. p. 923-931, 1988.

KIM H., et al. Reactive Oxygen Species Donors Increase the Responsiveness of Dorsal Horn Neurons and Induce Mechanical Hyperalgesia in Rats. **Neural Plasticity**. v. 2015. n. 293423, 2015.

LANGLEY, P.; RUIZ-IBAN. The association of pain with labor force participation, absenteeism, and presenteeism in Spain. **Journal Of Medical Economics**. Minneapolis, p. 835-845. out. 2011.

LEOPOLDINO, A. *et al.* Prevalence of low back pain in older Brazilians: a systematic review with meta-analysis. **Revista Brasileira Reumatologia**. v. 53, n. 3, p. 258–269, 2016.

LOESER J.D. The future. Will pain be abolished or just pain specialists? **Minnesota Medicine**. v. 84. p. 1-20, 2001.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology q. v. 137, p. 473–477, 2008.

MACHELSKA H., CELIK M.Ö. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. **F1000Research**. v. 22. p. 27-43, 2016.

MAGRINELLI, F.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. **Practical Neurology**. v. 13, n. 5, p. 292–307, 2013.

MASSZI, G.. Effects of vitamin D3 derivative--calcitriol on pharmacological reactivity of aortic rings in a rodent PCOS model. **Pharmacological Reports**. Budapest, p. 476-483. fev. 2013.

MEACHAM et al. Neuropathic pain: central vs. Peripheral mechanisms. **Current Pain and Headache Reports**. v. 6., 2017.

MEDINACELI, Luis de. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**. Washington, p. 634-643. set. 1982.

MEINELT, T. *et al.* Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substance of different qualities. **Aquatic Toxicology**. v. 83, n. 2, p. 93–103, 2007.

MIFFLIN, K. A.; KERR, B. J. The transition from acute to chronic pain: understanding how different biological systems interact. **Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie**, v. 61, p. 112-122, 2014.

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

MIRHOSSEINI, Naghmeh Z.. Both high and low plasma levels of 25-hydroxy vitamin D increase blood pressure in a normal rat model. **British Journal Of Nutrition**. Saskatoon, p. 1-12. out. 2016.

MASCITELLI, L., GRANT, W. B., GOLDSTEIN, M. R. Statins, vitamin D, and neuropathic pain. *Pain*, v. 152, n. 7, p. 1686-1687, 2011.

NAKAZATO-IMASATO, E.; KUREBAYASHI, Y. Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Life Sciences*. v. 84, n. 17–18, p. 622–626, 2009.

NAIK A.K., TANDAN S.K., DUDHGAONKAR S.P., JADHAV S.H., KATARIA M., PRAKASH V.R., KUMAR D. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *European Journal of Pain*. v. 10. p. 573-579, 2006.

NICKEL F.T., SEIFERT F., LANZ S., MAIHÖFNER C. Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*. v. 22: p. 81-91, 2012.

NORMAN, W. 1 beta, 25 (OH)2-vitamin D3 is an antagonist of 1 alpha,25 (OH)2-vitamin D3 stimulated transcalcitachia (the rapid hormonal stimulation of intestinal calcium transport). *Biochemical And Biophysical Research Communications*. Riverside, p. 1450-1456. dez. 1992.

OSSIPOV M.H., MORIMURA K., PORRECA F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*. v. 8. p. 143-51, 2014.

PASERO, C. Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain Management Nursing*. v. 5, n. SUPPL., p. 3–8, 2004.

PICAVET, H.; SCHOUTEN, J. Musculoskeletal pain in the Netherlands: prevalences, consequences and risk groups, the DMC(3)-study. *Pain*. v. 102, n. 1–2, p. 167–178, 2003.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunology Methods*, v.38, p.161-170, 1980.

PIMENTA, C. Conceitos culturais e a experiência dolorosa. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. v. 32, n. 2, 1998.

PIZZINO et al. Oxidative Stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 2017. n. 8416763., 2017.

POISBEAU et al. Cholecalciferol (Vitamin D3) Reduces Rat Neuropathic Pain by Modulating Opioid Signaling. *Molecular Neurobiology*. Strasbourg, p. 7208-7221. abr. 2019.

POLJSAK B., ŠUPUT D., MILISAVI I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 95. p. 67-92, 2013.

POOLE, Leslie B.. Introduction: What we do and do not know regarding redox processes of thiols in signaling pathways. **Free Radical Biology & Medicine**. North Carolina, p. 145-147. mar. 2015.

RIFFEL A.P., DE SOUZA J.A., SANTOS M. C., HORST A., SCHEID T., KOLBERG C., et al. Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Brain Research Bulletin**. v. 121. p. 169-177, 2016.

RIFFEL, A.P. Treatment with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol modulates oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**. p. 1-11. mar. 2018.

RIFFEL, Ana Paula Konzen. Co-administration of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol modifies ascorbic acid and attenuates p38, Akt, and TNF- $\alpha$  expression in spinal cord of rats with neuropathic pain. **Nutrire**. p. 1-10. jan. 2020.

ROBACZEWSKA, J. *et al.* Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society** v. 67, n. 3, p. 331–7, jun. 2016.

RONDANELLI, Mariangela et al. Food pyramid for subjects with chronic pain: foods and dietary constituents as anti-inflammatory and antioxidant agents. **Nutrition Research Reviews**. Pavia, p. 131-151. out. 2018.

SAHIN, Sadik. The protective effects of tacrolimus on rat uteri exposed to ischemia-reperfusion injury: a biochemical and histopathologic evaluation. **Resultados da Pesquisa Resultados da Web Fertility And Sterility**. Istanbul, p. 1176-1182. abr. 2014.

SALVEMINI, D. et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 951-966, 2011.

SALUM, E.. Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic wall and systemic oxidative stress in diabetic rats. **Diabetes Research And Clinical Practice**. Estonia, p. 243-249. maio 2013.

SANTOS, F. *et al.* The neural mobilization technique modulates the expression of endogenous opioids in the periaqueductal gray and improves muscle strength and mobility in rats with neuropathic pain. **Behavioral and Brain Functions**. v. 10, n. 1, p. 19, 2014.

SASSI, Francesca et al. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. **Nutrients**. Turin, p. 1-14. set. 2018.

SCHEID T., BOSCO L.D., GUEDES R.P., PAVANATO M.A., BELLÓ-KLEIN A., PARTATA W.A. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. **Journal of Neurochemistry**. v. 38: p. 935-942, 2013.

SCHEID, T. **Efeitos da administração de uma fração antioxidante de *schinus terebinthifolius* sobre parâmetros nociceptivos e de estresse oxidativo em sistema nervoso central de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática**. 2014. 113 páginas. Tese de

doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SCHEID, Taína. Effects of Methanol Fraction from Leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi on Nociception and Spinal-Cord Oxidative Biomarkers in Rats with Neuropathic Pain. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**. p. 1-11. maio 2018.

SEPIDARKISH, Mahdi. The effect of Vitamin D supplementation on oxidative stress parameters: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Pharmacological Research**. Tehran, p. 141-152. jan. 2019.

SIES, Helmut. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. Düsseldorf, p. 180-183. abr. 2015.

SÖDERGREN E. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. **Journal Of Biochemical And Biophysical Methods**. Uppsala, p. 137-146. nov. 1998.

SÖZBIR, E.; NAZIROGLU, M. Diabetes enhances oxidative stress-induced TRPM2 channel activity and its control by N-acetylcysteine in rat dorsal root ganglion and brain. **Metabolic Brain Disease**. Isparta, p. 385-393. abr. 2016.

SLOMINSKI, Andrzej T. Products of Vitamin D3 or 7-Dehydrocholesterol Metabolism by Cytochrome P450<sub>sc</sub> Show AntiLeukemia Effects, Having Low or Absent Calcemic Activity. **Plos One**. Tennessee, p. 1-13. mar. 2010.

THOMPSON D.A., HOBELMANN J.G., COMPTON P. Providing chronic pain management in the "Fifth Vital Sign" Era: Historical and treatment perspectives on a modern-day medical dilemma. **Drug Alcohol Dependence**. v. 173 p. 11-21, 2017.

TROMM, C.B. *et al.* Effect of different frequencies weekly training on parameters of oxidative stress. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v.14, n.1, p.52-60. 2012.

TUCKEY, Robert C.. The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. **Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**. Perth, p. 4-21. fev. 2019.

UBERTI, Francesca. Role of vitamin D3 combined to alginates in preventing acid and oxidative injury in cultured gastric epithelial cells. **Bmc Gastroenterology**. Novara, p. 1-13. out. 2016.

UDALL, M., KUDEL, I., CAPPELLERO, J.C., SADOSKY, A., KING-CONCIALDI, K., PARSONS, B., HLAVACEK, P., HOPPS, M., SALOMON, P.A., DIBONAVENTURA, M.D., CLARK, P., GARCIA, J.B.S. Epidemiology of physician-diagnosed neuropathic pain in Brazil. **Journal of Pain Research**, v. 12. p. 243-253. 2019.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North American**, v. 91.p. 1-12. 2007.

VAN HECKE, O. *et al.* Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**. v. 155, n. 4, p. 654–662, 2014.

VIETH, Reinhold. Tracer Kinetics and actions of oral and intraperitoneal 1,25-dihydroxyvitamin D3 administration in rats. **Kidney International**. Toronto, p. 857-861. mar. 1990.

YESIL, Hilal. Association between serum vitamin D levels and neuropathic pain in rheumatoid arthritis patients: A cross-sectional study. **International Journal Of Rheumatic Diseases**. Afyon, p. 431-439. fev. 2017.

YOON, Y.W.; LEE, D.H.; LEE, B.H.; CHUNG, K.; CHUNG, J.M. Different strains and substrains of rats show different levels of neuropathic pain behaviors. **Experimental Brain Research**. v. 129, n. 2, p.167-177, 1999.

ZHAO H., et al. The role of microglia in the pathobiology of neuropathic pain development: what do we know? **British Journal of Anaesthesia**. v. 118. p. 504-516, 2017.

WANG, H.D.; PAGANO, P.J.; DU, Y.; CAYATTE, A.J.; QUINN, M.T.; BRECHER, P.; COHEN, R.A. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. **Circulation Research**, v.82, p.810-818, 1998.

WANG, Jin. 20-Hydroxyvitamin D3 Inhibits Proliferation of Cancer Cells with High Efficacy while Being Non-toxic. **Anticancer Research**. Memphis, p. 739-746. mar. 2012.

WIECH, K. Deconstructing the sensation of pain: The influence of cognitive processes on pain perception. **Science**. v. 354, n. 6312, p. 584–587, 2016.

WU, Z., MALIHI, Z., STEWART, A. W., LAWES, C. M., SCRAGG, R. Effect of vitamin D supplementation on pain: a systematic review and meta-analysis. **Pain Physician**, v. 19, n. 7, p. 415-427, 2016.

## 10. ANEXO I



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 32295

**Título:** EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE VITAMINA D SOBRE NOCICEPÇÃO E PARÂMETROS OXIDATIVOS EM NERVO ISQUIÁTICO E MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA

**Vigência:** 30/01/2017 à 30/07/2017

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

WANIA APARECIDA PARTATA - coordenador desde 30/01/2017

MARIA DO CARMO QUEVEDO SANTOS - Aluno de Especialização desde 30/01/2017

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 03/04/2017 - SALA 330 - ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRAL UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 84 ratos Wistar machos de 200-300g provenientes do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Quinta-Feira, 13 de Abril de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética