

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Desenvolvimento de Novo Modelo Experimental de Dor Neuropática Baseado em
Ligadura do Ramo Sural do Nervo Isquiático

ALAN DOUGLAS DE LIMA ROCHA

Areia – PB

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Desenvolvimento de Novo Modelo Experimental de Dor Neuropática Baseado em Ligadura
do Ramo Sural do Nervo Isquiático

AUTOR: Alan Douglas de Lima Rocha

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Trabalho de conclusão de curso realizado e apresentado como requisito parcial para a obtenção de título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba, sob orientação do prof. Dr. Luis Felipe Souza da Silva.

Areia – PB

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alan Douglas de Lima Rocha

Desenvolvimento de Novo Modelo Experimental de Dor Neuropática Baseado em Ligadura
do Ramo Sural do Nervo Isquiático

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba

Aprovado em:

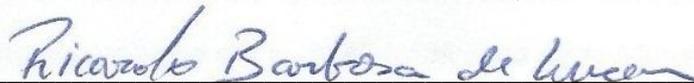
Nota:

Banca Examinadora



Prof. Dr. Luis Felipe Souza da Silva

Me. Márcio de Castro Menezes, UFPB



Dr. Ricardo Barbosa de Lucena, UFPB

Prof. Me. Márcio de Castro Menezes
Coordenação de TCC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus. Provedor de todas as graças e bênçãos.

Aos meus pais, que me trouxeram a este mundo e proveram todas as condições necessárias para que eu pudesse crescer e me desenvolver. Educaram-me, ensinaram a discernir certo e errado, me mostraram valores como fé, dignidade, honestidade, lealdade, garra e perseverança. E que, cada um do seu jeito, me amou.

A minha irmã. Com quem divido esta jornada há 22 anos. Que através das arengas e disputas me ajudou a aprender que no mundo todos precisam repartir o pão, porque isso é o que nos une e nos fortalece.

As minhas avós Francisca e Maria que junto com meu falecido avô Messias me mimaram como todo neto merece ser.

Aos meus tios e tias que estiveram presentes, me vendo crescer ajudando na minha educação e dando os puxões de orelha necessários na ausência dos meus pais.

Aos meus primos que cresceram junto comigo, como irmãos.

A todos os amigos que estiveram e que estão presentes em minha vida. Em especial a Kleber, Phablo e Hilquias, irmãos que a vida me deu.

A Josi. Moça especial que me tornou mais adulto, mais calmo e mais centrado. Que ouve e me aconselha nos meus anseios, preocupações e sonhos. Com quem pretendo construir o futuro.

A todos os meus professores que contribuíram com meu aprendizado desde o pré-escolar até hoje. Com os quais ainda espero continuar aprendendo.

A todos os meus colegas, companheiros de horas felizes e descontraídas como também de horas tensas e estressantes. Dos quais carregarei boas memórias por toda a vida. Através destes pude enxergar o mundo da vida social, com todas as suas belezas e sujeiras. E isso foi fantástico porque até aqueles que me fizeram algum mal me ensinaram alguma coisa.

Ao cachorro da minha família, que me recebe alegremente todos os dias quando eu volto para casa. Não importa se o dia dele foi bom ou ruim, se ele comeu ou está como fome, se passeou ou se passou o dia trancado, se está sadio ou doente, ele sempre vai me receber com a mesma alegria, não me deixando esquecer o quão aventureado e feliz é aquele que vive cercado pelos animais.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luis Felipe Souza da Silva que me recebeu como estagiário e me apresentou ao mundo da fisiologia. Foi meu mentor neste e em outros trabalhos. Contribuiu enormemente não só para minha formação profissional. Contribuiu para minha vida, na minha formação como cidadão. Um exemplo de que pessoas honestas, justas e boas também vencem. É um homem íntegro, cumpridor de suas obrigações, dotado de consciência social e que está sempre disposto a fazer o melhor para todos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPQ) que auxiliou no financiamento de matéria de consumo e equipamentos utilizados neste trabalho.

Ao Antônio da Silva Santos, pelo auxílio técnico com os animais e manutenção perfeita da organização no laboratório.

Aos colegas Angélica da Silva Oliveira, Johann Soares de Farias e Valber Onofre de Araújo que compartilharam um pouco de suas vidas no dia-a-dia do laboratório, auxiliando na condução dos experimentos e contribuindo intelectualmente para construção do trabalho.

RESUMO

ROCHA, Alan Douglas de Lima, Universidade Federal da Paraíba, setembro de 2013.
Desenvolvimento de Novo Modelo Experimental de Dor Neuropática Baseado em Ligadura do Ramo Sural do Nervo Isquiático. Orientador: Luis Felipe Souza da Silva.

A dor neuropática é iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso. Em 1988 Bennett e Xie desenvolveram o modelo clássico de dor neuropática por constrição crônica do ciático (CCC). Contudo o modelo de CCC provoca um déficit motor considerável, que pode interferir nos resultados obtidos. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de desenvolver um modelo de dor neuropática com o mínimo de alteração da função motora do membro afetado. Para tanto, 18 ratos Wistar foram separados em dois grupos. O primeiro foi submetido à cirurgia de CCC. E o segundo foi submetido a cirurgia de Ligadura do Ramo Sural do Nervo Isquiático (LRS). A sensibilidade dolorosa mecânica foi mensurada através do teste de Von Frey. A função motora foi avaliada pelo teste da pegada. Ao fim dos experimentos os animais foram eutanasiados e tiveram os músculos gastrocnêmio removidos para análise histológica. Os nossos resultados indicaram que os animais submetidos à LRS desenvolveram hiperalgesia equivalente à observada no modelo de CCC quando avaliados pelo teste de Von Frey. No teste da pegada observou-se que o grupo LRS apresentou níveis de alterações motoras significativamente menores que os animais do grupo CCC. Análises histológicas mostraram um nível de atrofia muscular do gastrocnêmio inferior no grupo LRS em comparação ao CCC. Assim os nossos resultados sugerem que o modelo LRS é tão eficiente quanto o modelo CCC no desenvolvimento de dor neuropática. Porém, o nosso modelo produz um comprometimento motor consideravelmente menor que o instaurado pela CCC.

Palavras-chave: Atrofia muscular, Hiperalgesia, Locomoção.

ABSTRACT

ROCHA, Alan Douglas de Lima, Universidade Federal da Paraíba, september, 2013.
Development of Neuropathic Pain Experimental Model Based on Ligation of the Sciatic Sural Branch. Adviser: Luis Felipe Souza da Silva.

Neuropathic pain is initiated or caused by a primary lesion or dysfunction in the nervous system. In 1988 Bennett and Xie developed the classic model of neuropathic pain by chronic constriction of the sciatic (CCS). However the CCS model causes a significant motor deficit, which may interfere with the results. This study was conducted in order to developing a neuropathic pain model with minimal alteration of motor function of the affected limb. A total of 18 Wistar rats were divided into two groups. The first underwent CCS surgery and the second group was submitted to surgical ligation of the Sciatic Nerve Sural Branch (LSB). The mechanical pain sensitivity was measured using the von Frey test. Motor function was evaluated by footprint test. At the end of the experiments the animals were euthanized and gastrocnemius muscles were removed for histological analysis. Our results indicated that animals submitted to LSB developed hyperalgesia equivalent to that observed in the CCS model when evaluated in von Frey test. Additionally the footprint test indicated that the LSB group had levels of motor impairment significantly lower than those of group CCS. Histological analysis showed that LSB produced a lower level of gastrocnemius muscle atrophy compared to the CCS. Thus our results suggest that the model LSB is as efficient as the CCS in the development model of neuropathic pain. However our model produces motor impairment significantly lower than that established by the CCS.

Keywords: muscular atrophy, hyperalgesia, Locomotion.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Objetivos gerais	10
1.2. Objetivos específicos	11
1.3. Justificativa	11
2. METODOLOGIA	12
2.1. Animais	12
2.2. Constrição Crônica do Ramo Sural do Nervo Isquiático	12
2.3. Testes Comportamentais para Alodinia, Hiperalgisia e atividade motora	13
2.3.1. Teste de Von Frey	13
2.3.2. Teste da Caminhada	14
2.4. Histologia	15
2.5. Análise dos Resultados	17
2.6. Protocolos Experimentais	17
3. RESULTADOS	18
4. DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

A dor neuropática é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como sendo a “dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso” (MERSKEY; BOGDUK, 1994). A lesão de nervo periférico provoca distintos graus de hiperalgesia e alodinia, os quais podem ser acompanhados por déficits sensoriais e motores (ZIMMERMANN, 2001; SOMMER, 2003). Esta dor dura mais que a fase inicial da lesão, podendo levar a distúrbios debilitantes que não são passíveis as terapias medicamentosas convencionalmente disponíveis (TODOROVIC; JEVTOVIC-TODOROCIV, 2013), como antiinflamatórios não esteroidais e analgésicos opióides (WOOLF; MANNION, 1999; SCHOLZ; WOOLF, 2002), por exemplo. Neste sentido diversos modelos já foram desenvolvidos para o estudo da dor neuropática com o intuito de se conhecer o mecanismo envolvido com o seu desenvolvimento e possibilitar a investigação de possíveis estratégias terapêuticas para o tratamento desta. Tal modelo deve ser de fácil reprodutibilidade e resultar em déficits sensoriais, com alodinia, hiperalgesia e dor espontânea durante um longo período.

O primeiro modelo de dor neuropática foi desenvolvido por Wall e colaboradores em 1979. Este modelo de dor neuropática era baseado na transecção do nervo isquiático, e produzia uma desnervação completa da porção distal do membro pélvico. A altura do plano médio da coxa, o nervo isquiático e o ramo safeno do nervo femoral eram seccionados e o coto proximal destes eram fortemente ligados, o que promovia a dessensibilização do membro. Porém, na tentativa de regeneração deste nervo ocorre a formação de neuroma, provocando dor, mesmo na ausência de qualquer estímulo sensorial da área. A dor neuropática produzida por este modelo pode ser avaliada pelo nível de autotomia do membro (WALL et al., 1979a; 1979b). Embora tenha sido utilizado em vários estudos, este modelo logo foi superado por não simular o desenvolvimento da dor neuropática resultante de uma lesão parcial do nervo e por autotomia ter sido contestado como sinal de dor neuropática (DECOSTERD; BERTA, 2009).

Em 1988 Bennett e Xie desenvolveram o modelo clássico de dor neuropática por constrição crônica do ciático (CCC), onde o nervo Isquiático é submetido a quatro ligaduras frouxas, imediatamente antes da trifurcação, com o objetivo de reduzir a circulação perineural. Este modelo desenvolve edema intraneural, isquemia focal e degeneração Walleriana. Neste modelo os animais desenvolvem repostas comportamentais sugestivas de dor espontânea, tais como autotomia, proteção do membro afetado, lambedura excessiva e deslocamento do peso corporal para o membro sadio. Adicionalmente, quando estimulados,

os animais apresentaram hiperalgesia mecânica e térmica, bem como alodinia mecânica e ao frio (BENNETT; XIE, 1988; ATTAL et al., 1990). Apesar do modelo desenvolvido por Bennett e Xie (1988) ser um dos mais utilizados atualmente, a CCC provoca um déficit motor considerável, o qual pode interferir nos resultados obtidos.

Em 1990 Seltzer et al. desenvolveu um modelo de ligadura parcial do nervo ciático (LPC), que utiliza uma única forte ligadura transneuronal que provoca a constrição de 1/3 a 1/2 do diâmetro do nervo ciático. Foram relatados como sinais comportamentais de dor espontânea proteção e lambadura excessiva do membro afetado. Quando estimulados os animais apresentaram alodinia ao frio, hiper-reatividade química, e hiperalgesia mecânica (SELTZER, 1990). Este modelo é amplamente utilizado por causar um dano parcial do nervo. Porém, apresenta uma desvantagem de reprodutibilidade devido à impossibilidade de identificar e realizar a constrição exata das mesmas fibras do nervo, em todos os animais.

Outro modelo é o de mononeuropatia periférica por Ligadura de Nervo Espinhal (LNE) Neste modelo os nervos espinhais L5 e L6 são dissecados e firmemente ligados distalmente ao seu gânglio da raiz dorsal. Ligadura de L4 não é viável, pois este possui uma maior abundância de fibras motoras, levando a uma deficiência motora grave que interfere nos testes comportamentais. Este modelo provoca alodinia mecânica, alodinia ao frio, hiperalgesia térmica e dor espontânea (KIM; CHUNG, 1992). Este modelo é vantajoso por apresentar uma maior exatidão no sítio de ligação e extensão da lesão. Porém, requer procedimentos cirúrgicos bastante complexos. Labuda e Little desenvolveram em 2005 um modelo de LNE baseado na ligadura de L5, esse modelo se mostrou menos complexo, bastante reprodutível e que causa menos dano ao tecido circunvizinho que o de L5/L6 (LABUDA; LITTLE, 2005).

As lesões de ramos distais dos nervos oferecem a vantagem de que eles podem ser mais facilmente definidos anatomicamente, ajudando a normalização dos procedimentos cirúrgicos. Neste sentido, a lesão do nervo com ramo preservado (NRP) em ratos é baseada na ligação e corte transversal dos nervos tibial e peroneal comum, deixando o nervo sural intacto (DESCORTED; WOOLF, 2000; BOURQUIN et al., 2006). Este modelo resulta em alodinia/hiperalgesia mecânica precoce, intensa e robusta e alodinia mecânica ao frio no território do nervo sural. Esta oferece a vantagem de poupar um nervo quase sensorial, em combinação com uma clara separação dos axônios lesionados e não lesionados distais à lesão. Neste mesmo sentido, desenvolveu-se o modelo de Secção dos Ramos Tibial e Sural (STS)

que promove firme ligadura e 2 mm abaixo desta, realiza-se secção dos ramos tibial e sural, poupando o ramo peroneal comum (LEE et al.,2000).

Recentemente, ficou demonstrado que o modelo de ligadura parcial do nervo safena (LPS) o qual se desenvolve através de uma ligadura em 1/3 à 1/2 do nervo safena, sendo este um ramo do nervo femoral, que inerva a parte medial da pata, leva ao desenvolvimento de sintomas relacionados à dor neuropática (WALCZAK et al., 2005). A relevância neste modelo é que a lesão de um nervo exclusivamente sensorial produz dor neuropática que pode ser estudada em terminações nervosas de pele (REEH, 1986).

A alodinia mecânica é uma sensibilização comportamental a um estímulo anteriormente inócuo. Sendo normalmente avaliada pela resposta de retirada do membro, após exercer contra este, pressão mecânica utilizando o Von Frey. Para executar os movimentos necessários para a retirada, são necessários grupos de músculos da perna tanto de função flexora, quanto extensora. Portanto, em um modelo animal que avalia a dor através do movimento de retirada do membro, o ideal é que as funções motoras estejam intactas. No entanto, quase todos os modelos de dor neuropática levam a paresia ou paralisia dos músculos dos membros inferiores (VADAKKAN; JIA; ZHUO, 2005).

Apesar dos diversos modelos já desenvolvidos para o estudo da dor neuropática, apenas Vaddakan em 2005 conduziu um estudo no sentido de tentar produzir um modelo de dor neuropática sem alterar a motricidade do membro afetado. Na maior parte dos modelos animais de dor neuropática, tanto os nervos sensoriais quanto os motores são lesados, levando à alteração de ambas as vias, dificultando a avaliação do sistema sensorial, o que pode produzir dados menos consistentes. Além disso, nenhum estudo de dor neuropática utilizou a função motora como parâmetro. Por esses motivos, e considerando o bem estar animal, um modelo ideal de dor neuropática deve produzir respostas comportamentais nociceptivas sem que haja interferência na função motora ou lesão muscular. Para tentar atender estas exigências desenvolvemos um modelo comportamental de dor neuropática, tendo como alvo o ramo sural do nervo isquiático.

1.1. Objetivos gerais

Sabendo que o elevado grau de perda da função motora causado por alguns modelos de dor neuropática dificultam a avaliação e interpretação dos resultados obtidos e ainda trazem desconforto excessivo aos animais, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo

de desenvolver um modelo de dor neuropática com o mínimo de alteração da função motora do membro afetado.

1.2. Objetivos específicos

- avaliar a viabilidade de um modelo de dor neuropática baseado na constrição do ramo sural do nervo isquiático;
- avaliar o nível de perda funcional infligida por constrição do ramo sural do nervo isquiático;
- avaliar o grau de atrofia infligido ao musculo gastrocnêmio por constrição do ramo sural do nervo isquiático.
- desenvolver um modelo de dor neuropática que proporcione uma melhor qualidade de vida aos animais submetidos ao mesmo;

1.3. Justificativa

Na clínica, a dor neuropática é uma das síndromes dolorosas de mais difícil tratamento, uma vez que frequentemente não responde às terapias convencionais. Sendo assim, é de suma importância que se desenvolvam modelos, os quais permitam o estudo dos mecanismos envolvidos com o desenvolvimento e manutenção da mesma. Contudo, nos modelos utilizados atualmente, além da hiperalgesia é comum a ocorrência de um déficit motor, o qual por vezes pode interferir nos resultados obtidos. Dessa maneira, é interessante o desenvolvimento de um modelo de dor neuropática o qual apresente uma hiperalgesia com déficit motor mínimo ou mesmo ausente.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais

Nesse estudo foram utilizados 18 ratos Wistar pesando entre 200 e 250 gramas. Esses animais foram alojados em grupos de 4-6 animais em caixas de polipropileno (16cm de altura x 34cm de largura x 41cm de comprimento), forrada com serragem, alimentados com ração granulada e água de torneira *ad libitum* com ciclo claro-escuro de 12 horas (início do período claro as 06:00). Todos os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação em animais de laboratório estabelecidos pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e submetidos a Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba.

2.2. Constrição Crônica do Ramo Sural do Nervo Isquiático

Para realização da lesão do ramo sural do nervo isquiático, 9 animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (8 mg/kg) por via intraperitoneal, sendo feita, em seguida, a tricotomia e antissepsia com álcool iodado da coxa esquerda. Na sequência foi feita uma incisão na porção média da coxa e dissecação do bíceps femoral para exposição do nervo isquiático. A lesão por constrição crônica do sural foi realizada mediante isolamento do ramo sural do nervo isquiático. Neste foram realizadas 4 ligaduras com fios de algodão (4,0) tendo 1 a 2 milímetros de espaçamento entre elas (FIGURA 1). O grau de constrição do sural foi suficiente para retardar, mas não impedir a circulação da vasculatura perineural. Ao término do procedimento a incisão foi suturada com fios de algodão (4,0) e uma nova antissepsia foi realizada.

Os 9 animais do grupo controle foram submetidos ao modelo desenvolvido por Bennett and Xie (1988). Para tal, foram anestesiados com uma associação de cloridrato de cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (8 mg/kg) por via intraperitoneal, sendo feita, em seguida, a tricotomia e antissepsia com álcool iodado da coxa esquerda. Na sequência foi feita uma incisão na porção média da coxa e dissecação do bíceps femoral para exposição do nervo isquiático. Em seguida foi identificado o ponto de trifurcação do nervo. Acima desta foram realizadas 4 ligaduras com fios de algodão (4,0) tendo 1 a 2 milímetros de espaçamento entre elas (FIGURA 1). O grau de constrição do isquiático foi suficiente para retardar, mas não

impedir a circulação da vasculatura perineural. Ao término do procedimento a incisão foi suturada com fios de algodão (4.0) e uma nova antisepsia foi realizada.

Os animais operados foram colocados em caixas individuais com água e ração *ad libitum* durante a recuperação anestésica, depois foram devolvidos a caixa coletiva antes acomodados, onde permaneceram por todo experimento.

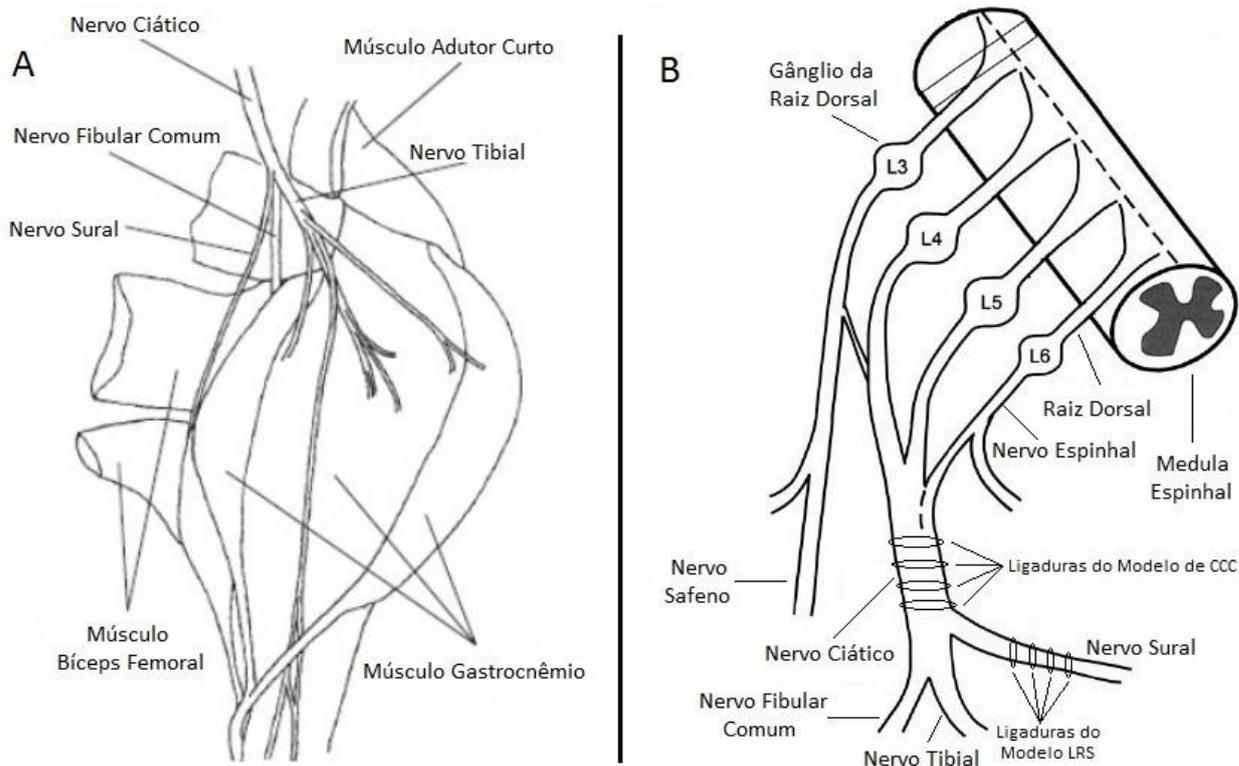


Figura 1 – (A) Figura esquemática representando a localização do nervo isquiático com seus ramos tibial, fibular comum e sural no membro posterior do rato (Adaptado de LEE et al., 2000). (B) Figura esquemática representando a inervação do membro posterior do rato e os sítios das ligaduras dos modelos CCC e LRS (Adaptado de DECOSTERD; WOOLF, 2000).

2.3. Testes Comportamentais para Alodinia, Hiperalgisia e Atividade Motora.

2.3.1. Teste de Von Frey

O teste de Von Frey foi realizado para se verificar o desenvolvimento de alodinia e hiperalgisia. Para tanto, os animais foram colocados em compartimentos de vidro (15cm de altura x 15cm de largura x 20cm de comprimento), sobre uma tela de metal, a qual permitia o acesso às patas do animal pela sua superfície inferior (FIGURA 2). Os animais foram habituados à situação experimental por dois dias, antes do início dos testes comportamentais. Para tanto eles foram colocados nos compartimentos de vidro por 30 minutos, porém nenhum

teste foi realizado. No dia do experimento os animais foram alocados nas caixas de vidro por 30 minutos e, na sequência, foram testados. O teste utilizando o Von Frey eletrônico possibilitou a avaliação da alodinia mecânica por meio da aplicação deste na região plantar do membro posterior esquerdo (FIGURA 2). Este consiste de um equipamento capaz de registrar a força exata aplicada sobre uma ponteira de 0,5mm² de polipropileno a ele conectada. Esta ponteira foi aplicada perpendicularmente contra a área central da superfície plantar do membro posterior esquerdo com aumento gradual na pressão até atingir força suficiente para evocar uma resposta característica de retirada do membro. Esta força máxima ficou registrada no equipamento. A média de 3 medições foi considerado como o limiar de retirada do membro (LRM). A redução no LRM foi interpretada como hipersensibilidade ou alodinia cutânea e o aumento na LRM como analgesia cutânea. O teste de Von Frey foi realizado previamente para obtenção de linha de base (instantes antes do procedimento cirúrgico) e após o terceiro, sétimo e décimo quarto dia após a realização da cirurgia.

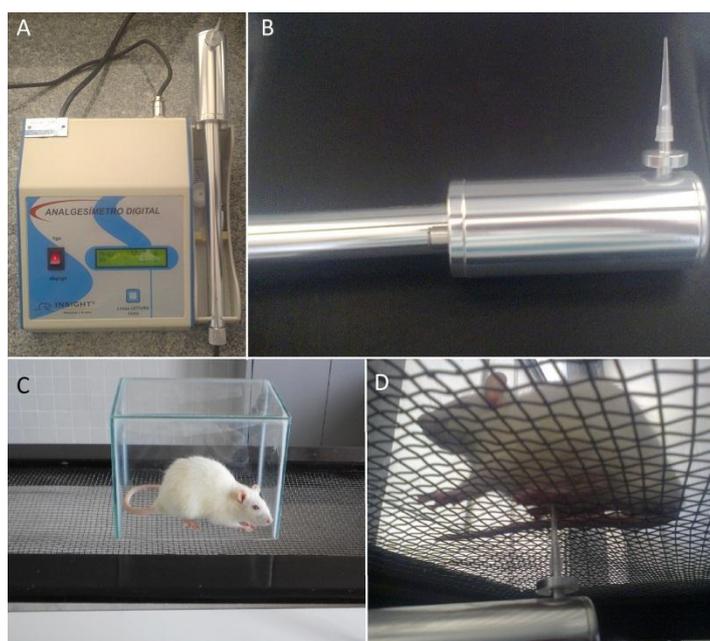


Figura 2 – (A) Von Frey eletrônico. (B) Imagem detalhando o sensor do Von Frey eletrônico. (C) Ambiente experimental de teste. (D) Aplicação do Von Frey eletrônico na superfície plantar do membro posterior esquerdo do rato.

2.3.2. Teste da Caminhada

A alteração da motricidade induzida pela ligadura do nervo foi avaliada por meio do teste da caminhada. O teste da caminhada consiste no registro e avaliação das alterações no formato das pegadas deixadas pelos animais em uma superfície de papel branco. Para a

realização do teste da caminhada os animais tiveram seu membro pélvico esquerdo tingido com tinta guache. Na sequência os mesmos foram posicionados na extremidade de um túnel de vidro (10cm de altura x 10cm de largura x 100cm de comprimento) , que se encontra sobre uma folha de papel branco, com uma caixa escura (15cm de altura x 40cm de largura x 30cm de comprimento) na extremidade oposta (FIGURA 3). A caixa escura foi utilizada para fazer com que o animal cruzasse a extensão do túnel de vidro, uma vez que ratos apresentam uma predileção por locais escuros, permitindo assim que este ao se locomover para outra extremidade deixasse marcado a superfície de contato do membro no papel. Os animais foram habituados à situação experimental por dois dias, antes do início dos testes comportamentais. Para tanto, eles foram colocados na extremidade do túnel de vidro por 3 vezes, porém não tiveram o membro posterior esquerdo tingido em tinta guache. No dia do experimento os animais foram alocados novamente no túnel, tendo desta vez o membro posterior esquerdo tingido com tinta guache, de modo que o mesmo deixe suas impressões sobre o papel branco durante o percurso pelo túnel. A impressão do membro deixada sobre o papel foi, posteriormente, escaneada e o comprimento da pegada, largura da pegada e área da pegada foram avaliados com auxílio do programa de computador Coreldraw 15. O teste da caminhada foi realizado previamente para obtenção de linha de base (instantes antes do procedimento cirúrgico) e após o terceiro, sétimo e décimo quarto dia após a realização da cirurgia.

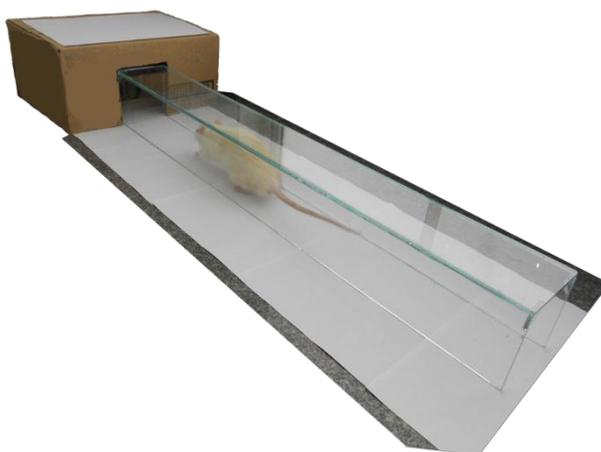


Figura 3 – Ambiente experimental do teste da caminhada.

2.4. Histologia

Ao término dos experimentos os animais foram eutanasiados com super-dosagem de cetamina (225mg/kg) e xilazina (24mg/kg) por via intraperitoneal. Posteriormente, foi

realizada a dessecação dos músculos gastrocnêmio de ambos os membros posteriores. Estes foram processados conforme a seguinte metodologia:

- Fixação: o material coletado foi mantido em formol a 10% e aguardou, no mínimo, 72h para melhor fixação, em volume 10 vezes maior do que o da peça a ser fixada;
- Desidratação: o material já fixado foi desidratado gradativamente através de uma bateria de concentração crescente de álcool etílico, divididos em quatro concentrações (70%, 80%, 90% e álcool absoluto), permanecendo por uma hora em cada concentração;
- Diafanização: para retirar as impurezas das amostras e ao mesmo tempo facilitar a entrada da parafina, as peças foram mergulhadas em xilol puro, por onde ficaram por 3 horas, sendo trocado a cada hora para uma melhor limpeza;
- Parafinização: as amostras foram mergulhadas em dois banhos de parafina líquida a 56°C para que houvesse a penetração da mesma em toda a peça de maneira homogênea, ficando uma hora em cada banho;
- Inclusão: com o auxílio de um dispensador de parafinas, as amostras parafinadas foram incluídas cada uma em um molde que recebeu a parafina líquida a 56°C, objetivando formar um bloco da amostra parafinada, que em temperatura ambiente, se solidificou e ficou pronta para o corte;
- Microtomia: através do micrótomo, os blocos de parafina com as amostras incluídas foram sutilmente cortadas com uma navalha apropriada, onde foram obtidos cortes ultrafinos de 5µm de espessura, posteriormente, colocados em banho-maria para melhor distribuição do corte e capturados por lâminas de microscopia. Após a secagem em estufa da parafina nas lâminas, elas ficaram prontas para serem coradas.
- Coloração: as lâminas foram coradas pela técnica padrão de HE (hematoxilina e eosina), que consiste em diferenciar estruturas celulares por sua afinidade basofílica ou eosinofílica dos corantes aos componentes celulares.

Tais lâminas foram avaliadas para observação dos processos de atrofia destes músculos. Os cortes dos músculos foram avaliados através de microscopia utilizando-se o aumento de 20X e a partir do número de fibras musculares com característica de atrofia, foi estabelecido um escore de atrofia para os músculos. O escore de atrofia considerou o número de fibras atrofiadas por área do tecido. Assim, o escore 0 corresponde a ausência de fibras atrofiadas, 1 a presença de 5 – 10 % de fibras atrofiadas, 2 de 11 – 20 % de fibras atrofiadas e 3 mais de 20 % de fibras atrofiadas por área de tecido.

2.5. Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos em valores médios \pm o erro padrão da média (EPM). Para análise dos testes de Von Frey e caminhada foi utilizada uma análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) para medidas repetidas, onde as variáveis foram o tempo (fator repetido) e o tratamento (fator independente), seguido por um pós-teste de Tukey para avaliar as diferenças entre os grupos. Os dados do escore de atrofia foram expressos em valores medianos com os quartis superior e inferior. Na análise estatística do escore de atrofia, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

2.6. Protocolos Experimentais

Experimento 1: Efeito da cirurgia experimental de Ligadura do Ramo Sural do Nervo Isquiático no desenvolvimento de Dor Neuropática.

Nesse protocolo foram utilizados 18 animais, divididos em 2 grupos de nove animais. Em um dos grupos os animais foram submetidos à LRS e no segundo grupo, outros 9 animais foram submetidos à CCC. Os animais de ambos os grupos foram submetidos ao teste comportamental para avaliar a sensibilidade mecânica pelo teste de von Frey, previamente a cirurgia e 3, 7 e 14 dias após a cirurgia.

Experimento 2: Efeito da cirurgia experimental de Ligadura do Ramo Sural do Nervo Isquiático na atividade motora.

Nesse protocolo os mesmos animais do experimento um, que foram divididos nos grupos CCC e LRS foram submetidos ao teste comportamental de atividade motora (Teste da Caminhada) previamente a cirurgia e 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. Vale ressaltar que o experimento 2 foi realizado no mesmo dia e após o experimento 1.

Experimento 3: Comparação entre o nível de atrofia do músculo gastrocnêmio desenvolvida pela cirurgia experimental de Ligadura do Ramo Sural do Nervo Isquiático e pela cirurgia de Constrição Crônica do Nervo Ciático.

Ao término dos experimentos 1 e 2, os animais de ambos os grupos (CCC e LRS) foram eutanasiados para a retirada do músculo gastrocnêmio dos membros direito e esquerdo, para montagem de lâminas histológicas para posterior avaliação do grau de atrofia.

3. RESULTADOS

Após a cirurgia para LRS, os animais apresentaram um comportamento de proteção do membro lesado e uma leve redistribuição de peso nos membros posteriores, depositando mais peso no membro direito. Estes sinais foram cada vez mais sutis até o fim do experimento. Enquanto os animais submetidos a CCC apresentaram um evidente comportamento de proteção do membro lesado e um acentuado grau de redistribuição de peso nos membros posteriores, mantendo por vezes, o membro esquerdo erguido. Em ambos os grupos não houve alteração no comportamento geral de interação com os outros animais, nem na ingestão de água e comida. Não houve lesões corporais ou autotomia.

No que tange a indução de dor neuropática, os nossos resultados mostram que os modelos de CCC e LRS produziram níveis de alodinia e hiperalgesia estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Neste sentido, os animais de ambos os grupos apresentaram uma redução no LRM observada já no terceiro dia após a cirurgia e que permaneceu durante todo o período experimental (FIGURA 4).

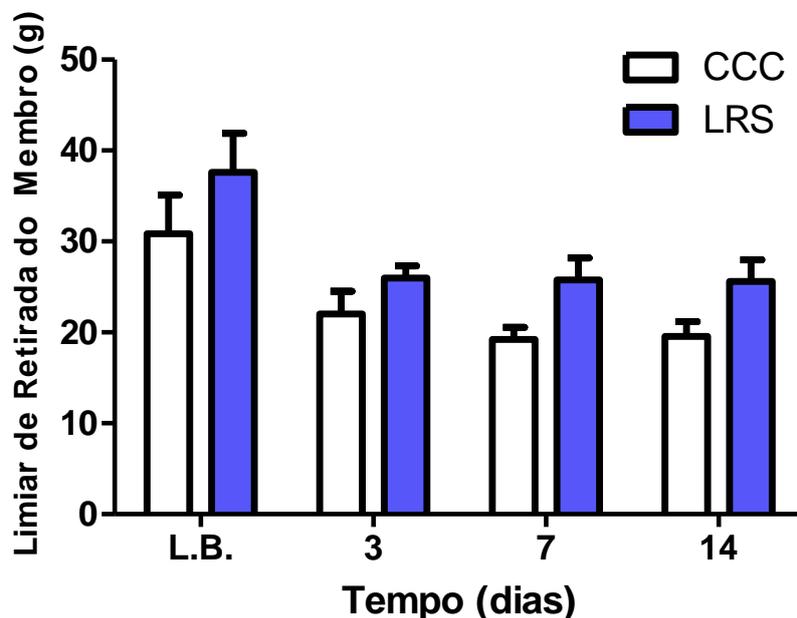


Figura 4 - Decurso temporal em dias das variações médias \pm EPM no Limiar de Retirada do Membro, em gramas, dos animais submetidos aos modelos de ligadura por CCC ou LRS.

Essa redução no LRM sugere a ocorrência de alodinia ou hiperalgesia do membro lesionado. A realização da análise estatística mostrou que a lesão do nervo em ambos os

modelos foi capaz de produzir uma redução significativa no LRM ao longo do tempo, quando comparados com suas respectivas medidas de LRM na linha de base ($p < 0,05$).

O teste de caminhada foi realizado em todos os animais para a obtenção de linha de base antes dos procedimentos cirúrgicos e repetido após o terceiro, sétimo e decimo quarto dia depois das cirurgias. A realização do teste de caminhada mostrou que o modelo de CCC produziu alterações significativas nas medidas longitudinais do membro lesado, provocando um aumento significativo destas, quando comparadas com os valores da linha de base ou com o modelo LRS (FIGURA 5). Por outro lado, o modelo de LRS não produziu mudanças significativas na medida longitudinal da pegada do membro lesado ao longo de todo experimento (FIGURA 5).

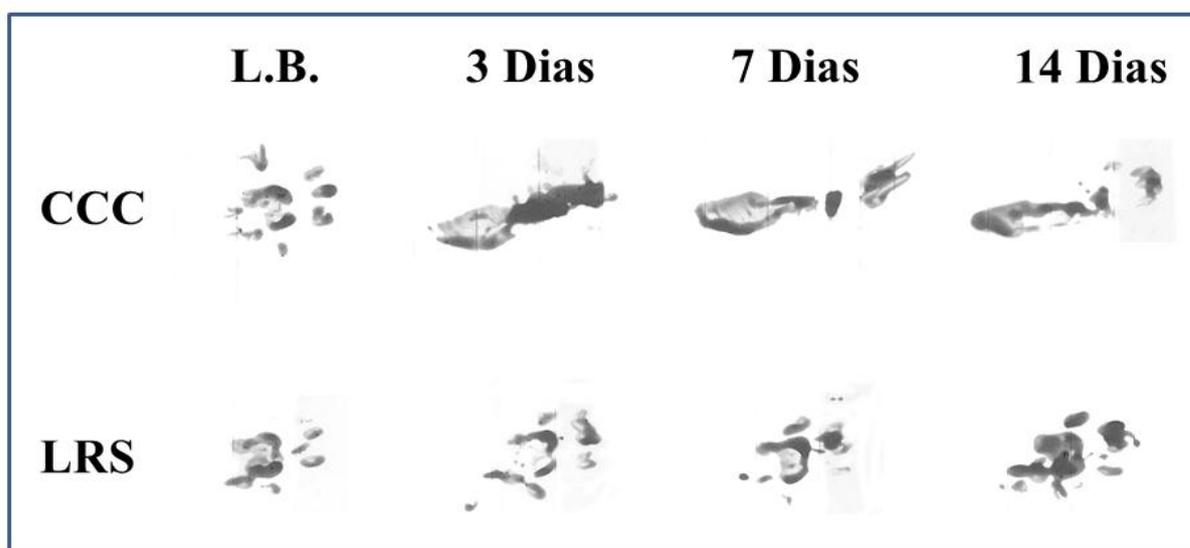


Figura 5 – Impressão da pata traseira esquerda de um animal representativo de cada um dos grupos.

A aplicação da análise estatística indicou haver interação entre os grupos, indicando um efeito das diferentes ligaduras ao longo do tempo ($p < 0,001$). Neste sentido, foi indicado que os animais do grupo LRS apresentaram medidas longitudinais do membro significativamente menores que os animais que sofreram a cirurgia de CCC. As medidas de comprimento longitudinal do membro dos animais do grupo LRS, não apresentaram alterações significativas nas suas medidas ao longo de todo o período experimental, quando comparadas com as medidas da linha de base ($p > 0,05$) (FIGURA 6).

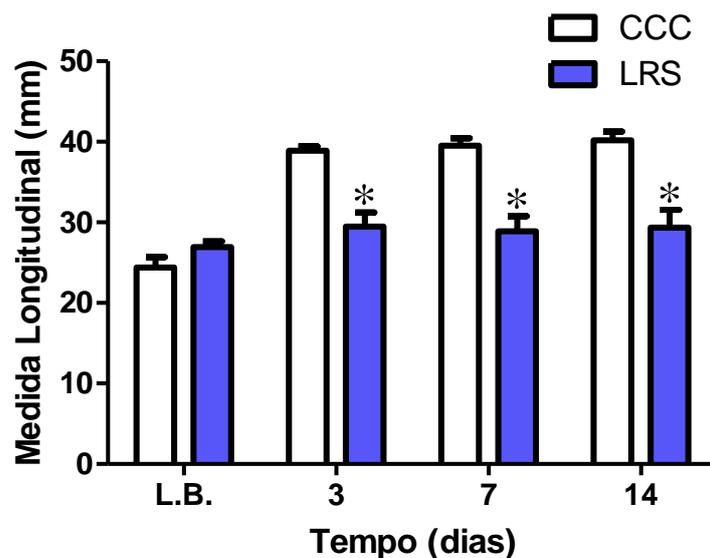


Figura 6 - Decurso temporal em dias das variações médias \pm EPM na medida longitudinal, em milímetros, da região plantar esquerda dos animais submetidos aos modelos de ligadura por CCC ou LRS. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CCC.

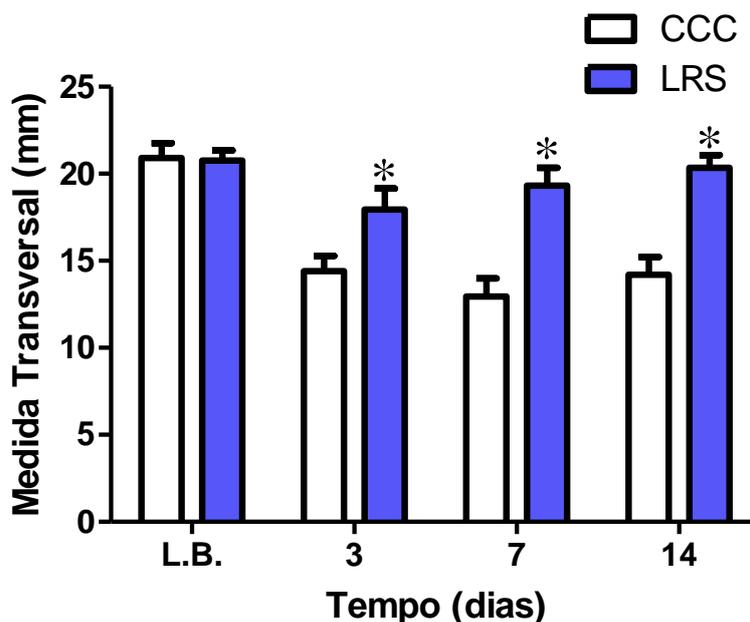


Figura 7 - Decurso temporal em dias das variações médias \pm EPM na medida transversal, em milímetros, da região plantar esquerda dos animais submetidos aos modelos de ligadura por CCC ou LRS. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CCC.

A FIGURA 7 representa os valores médios das medidas transversais da porção plantar do membro esquerdo, quando em contato com o solo em ambos os modelos experimentais. A aplicação da análise estatística indicou haver interação entre os grupos, indicando um efeito das diferentes ligaduras ao longo do tempo ($p < 0,001$). Neste sentido, percebe-se que o

modelo de CCC produziu reduções significativas nas medidas transversais da pata, após a cirurgia. Essas alterações permaneceram por todo o período experimental. Por outro lado, o modelo de LRS, não produziu alterações significativas na medida transversal da pegada da região plantar, ao longo de todo o período experimental.

A análise histológica do músculo gastrocnêmio esquerdo mostrou que a os animais submetidos a LRS apresentaram graus de atrofia menores que os animais com CCC (FIGURA 8). A análise estatística indicou haver uma diferença estatística significativa no escore de atrofia dos grupos LRS e CCC ($p < 0,05$). A análise histológica do gastrocnêmio direito de ambos os grupos não mostrou alterações.

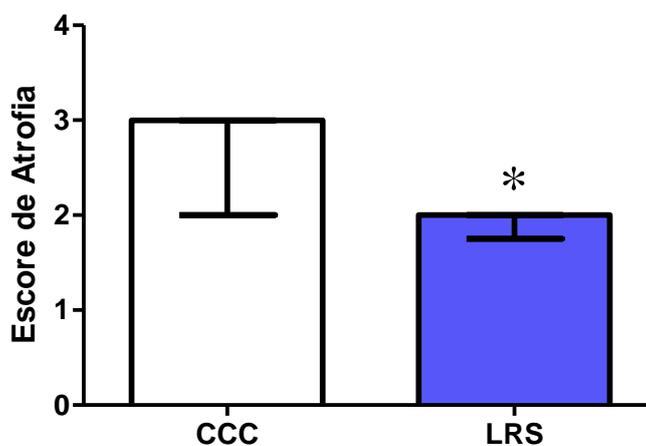


Figura 8 – Valores medianos com os quartis inferior e superior do escore de atrofia do músculo gastrocnêmio esquerdo dos animais submetidos aos modelos de ligadura por CCC ou LRS. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CCC.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo confrontou o modelo de dor neuropática de CCC desenvolvido por Bennet e Xie em 1988 com o modelo de LRS, desenvolvido em nosso laboratório. Os nossos resultados mostraram que ambos os modelos produziram níveis semelhantes de dor neuropática. Contudo, o modelo de LRS produziu alterações motoras significativamente menores que o modelo de CCC, quando avaliados pelo teste de caminhada. Além disso, os animais submetidos ao modelo de CCC apresentaram um grau de atrofia muscular do músculo gastrocnêmio maior que os ratos submetidos ao modelo de LRS.

O desenvolvimento de um modelo animal que possa ser utilizado para avaliar as respostas comportamentais de dor neuropática produz uma ferramenta muito valiosa (VADAKKAN; JIA; ZHUO, 2005). O desenvolvimento de alodinia tátil e hiperalgesia são características típicas de uma variedade de dores neuropáticas, incluindo a neuropatia por diabetes, neuralgia pós-herpética, neuropatias tóxicas, neuropatias por compressão e trauma neural (ATTAL; BOUHASSIRA, 2004). Assim, um modelo de dor neuropática capaz de simular tais parâmetros em ratos permitiria o estudo dos mecanismos envolvidos na dor neuropática observada nestas enfermidades (VADAKKAN; JIA; ZHUO, 2005). Além disso, modelos de dor neuropática possibilitam a aplicação de testes eletrofisiológicos, moleculares, e estudos de aplicação terapêutica em diferentes condições experimentais.

Com base nos resultados adquiridos através da avaliação da sensibilidade mecânica, por meio do teste Von Frey, é possível sugerir que o modelo de LRS é capaz de desenvolver nível semelhante de dor neuropática ao provocado pelo modelo de CCC de Bennett e Xie. Em ambos os modelos, observou-se uma queda substancial no LRM já no terceiro dia após o procedimento cirúrgico. Corroborando modelos anteriores, tais limiares permaneceram reduzidos pelo menos até duas semanas após a cirurgia (SELTZER, 1990; DESCORTED; WOOLF, 2000; LEE et al., 2000; WALCZAK et al., 2005). Esta redução no LRM pode ser interpretada como desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia, os quais são sinais clássicos de dor neuropática (ATTAL; BOUHASSIRA, 2004). Assim, os nossos resultados sugerem que o modelo de LRS foi eficiente no desenvolvimento de dor neuropática.

No que tange a resposta motora, os dados obtidos no teste da caminhada evidenciou que o modelo LRS produz uma alteração da função motora do membro consideravelmente inferior ao causado pelo modelo de CCC. Em um modelo animal que avalia a dor através do movimento de retirada do membro, é extremamente importante que as funções motoras

estejam preservadas (VADAKKAN; JIA; ZHUO, 2005). Neste sentido, os animais submetidos ao LRS tiveram uma alteração mínima do apoio do membro no solo, mantendo o peso distribuído adequadamente entre as terceiras falanges e os coxins plantares. Por outro lado, os animais submetidos à CCC alteraram completamente este apoio, deixando de usar as terceiras falanges e passando a usar metatarsos e calcâneo para auxiliar na caminhada, além de redistribuir o peso, desviando parte deste para o membro contralateral. Vale salientar que o fato de animal manter um correto apoio sobre o membro, torna a resposta de retirada do membro mais evidente quando evocada pelo teste de Von Frey.

Não se pode deixar de observar que o LRS propicia uma maior qualidade de vida aos animais durante o período experimental. Basta observar as alterações como autotomia, proteção do membro afetado, lambedura excessiva e deslocamento do peso corporal para o membro sadio, relatadas em outros modelos que não foram observadas no LRS (WALL et al., 1979; BENNETT; XIE, 1988; SELTZER, 1990; KIM; CHUNG, 1992; DESCORTED; WOOLF, 2000; LEE et al., 2000; WALCZAK et al., 2005). Assim, ao manter a função do membro, o animal não precisa se readaptar a uma nova condição, o que exigiria deste, redistribuição de peso, que pode levar a uma sobrecarga do membro direito. Tal condição, também exigiria maiores períodos de descanso e dificuldade em apoiar-se sobre os membros pélvicos para alcançar a ração e a água.

Os resultados apresentados pelo exame histológico do músculo gastrocnêmio dos membros que passaram por cirurgia para desenvolvimento de ambos os modelos, mostram que os animais submetidos ao LRS desenvolveram um nível de atrofia muscular inferior ao desenvolvido pelos animais submetidos ao CCC. Tal atrofia, provavelmente é desencadeada pelo grau de desnervação produzido nos diferentes modelos. Alguns estudos mostraram que a desnervação de um músculo irá causar uma perda progressiva de massa muscular, tamanho das fibras e composição da estrutura contrátil, condição esta conhecida como atrofia por desnervação (SUNDERLAND; RAY 1950; FU et al., 1995). Além disso, outras justificativas podem explicar a atrofia observada: a primeira seria o fato de o animal perder parcialmente o controle da função motora do membro; a segunda seria a redistribuição do peso e desvio de parte deste, para o membro contralateral. Como apontado por Deleo et al. (1994), dois critérios são essências para qualquer modelo animal de dor neuropática: ter fácil execução e alta reprodutibilidade. Neste sentido, existem algumas limitações em alguns modelos desenvolvidos anteriormente empregando lesão do nervo isquiático parcial: (1) não é possível separar as fibras nervosas lesadas e intactas, porque eles coexistem no tronco nervoso (CCC e

LPC); (2) pode haver regeneração sobre o local da ligadura (LPC e LNE); (3) a realização da lesão pode ser complicada, impossibilitando o controle do número de fibras lesadas (CCC e LPC); e (4) os modelos não podem ser utilizados numa situação em que a manipulação experimental requer especificamente nervos periféricos (CCC, LPC e LNE) (LEE et al., 2000). No modelo atual, essas limitações podem ser excluídas ou pelo menos minimizadas: (1) as fibras lesadas são apenas as do ramo sural; (2) embora possa haver alguma regeneração, está não reverte o efeito do modelo, graças a extensa área abrangida pelas quatro ligaduras; (3) o modelo possui metodologia fácil e a realização da lesão é simples; e (4) o modelo se utiliza exclusivamente de inervação periférica.

5. CONCLUSÃO

Assim, os nossos resultados sugerem que o modelo LRS produz níveis de alodinia e hiperalgesia desejados para um modelo de dor neuropática e compatíveis com o modelo clássico desenvolvido por Bennett e Xie (1988). Adicionalmente, tal modelo produz um baixo nível de alteração de função motora, menor atrofia muscular e obtenção de dados através do teste de Von Frey mais confiáveis. Além disso, o presente modelo animal é de fácil execução e reprodução. Outro ponto a favor do LRS é o fato deste propiciar uma maior qualidade de vida aos animais durante o período experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTAL, N. et al. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. **Pain**, Amsterdam, v. 41, n 2, p. 235-251, may. 1990.

ATTAL, N.; BOUHASSIRA, D. [Neuropathic pain: experimental advances and clinical applications]. **Rev Neurol Paris**. v.160, n 2, p. 199-203, fev. 2004.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, Amsterdam, v. 33, n 1, p. 87-107, apr. 1988.

BOURQUIN, A. F. et al. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. **Pain** v. 122, n 1-2, p. 14.e1-14. May. 2006

DECOSTERD, I.; BERTA, T. Animal Models and Neupathic Pain In: BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, M. C. Science of Pain. San Diego: Elsevier Inc. p. 857-864. 2009.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**. v. 87, n. 2, p. 149-158. Aug. 2000.

DELEO, J.A. et al. Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. **Pain**. v.56, n. 1, p. 9-16. 1994.

FU, S.Y.; GORDON T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. **J Neurosci**. Alberta, v. 15. n. 5, p. 3886-3895. May. 1995.

KIM, S.H.; CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**. v. 50, n. 3, p. 355-363. Sep. 1992.

LABUDA C.J.; LITTLE P.J. Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. **J. Neurosci**. v. 144, n. 2, p. 175-181. Dec. 2005.

LEE, B.H. et al., An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. **Neuroreport**. v.11, n. 4, p. 657-661. Mar. 2000.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. **Pain suppl.** Amsterdam: IASP Press. v. 3, p. 1-226. 1986.

REEH, P. W. Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. **Neurosci. Lett.** v. 66, n.2, p. 141–146. May. 1986.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, New York, v. 5, n. 942, p. 1062–1067, oct. 2002.

SELTZER, Z. et al. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, Amsterdam, v. 43, n 2, p. 205-218. Nov. 1990.

SOMMER, C. Painful neuropathies. **Current Opinion in Neurology**, Philadelphia, v. 16, n. 5, p. 623-628, oct. 2003.

SUNDERLAND, S.; RAY, L. J. Denervation changes in mammalian striated muscle. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 13, n. 3, p. 159–177. Aug. 1950.

TODOROVIC, S. M.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. Neuropathic pain: role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling. **Pflügers Archiv - European journal of physiology**, Berlin, v. 465, n. 7, p. 921-927. jan. 2013

VADAKKAN, K.I.; JIA, Y.H.; ZHUO, M. A behavioral model of neuropathic pain induced by ligation of the common peroneal nerve in mice. **J. Pain**, v.6, n. 11, p. 747–756. Nov.2005.

WALCZAK, J. S. et al. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. **Neuroscience**. v. 132, n.4, p. 1093–1102. 2005.

WALL, P. D. et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. **Pain**, Amsterdam, v. 7, n 2, p. 103-111, oct. 1979a.

WALL, P. D. et al. The production and prevention of experimental anesthesia dolorosa. **Pain**. Amsterdam, v 6, n. 2, p. 175–182. Apr. 1979b.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: a etiology, symptoms, mechanisms, and management. **The Lancet**, London, v. 353, n. 9168, p. 1959-1964, jun. 1999.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal Pharmacology**, Amsterdam, v. 429, n 1-3, p. 23-37, oct. 2001.