

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Maria do Carmo Quevedo Santos

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NOCICEPTIVO E DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR
CONSTRIÇÃO CRÔNICA GRADUAL NO NERVO ISQUIÁTICO**

Porto Alegre

2017

Maria do Carmo Quevedo Santos

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NOCICEPTIVO E DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR
CONSTRIÇÃO CRÔNICA GRADUAL NO NERVO ISQUIÁTICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Fisiologia

Orientador: Profa. Dra. Wania Aparecida Partata

Porto Alegre

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Quevedo Santos, Maria do Carmo

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NOCICEPTIVO E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR
NEUROPÁTICA INDUZIDA POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA GRADUAL
NO NERVO ISQUIÁTICO / Maria do Carmo Quevedo
Santos. -- 2017.

79 f.

Orientadora: Wania Aparecida Partata.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Dor Neuropática. 2. Estresse Oxidativo. 3.
Testes comportamentais. 4. Medula espinal. 5. Dor
Neuropática Graduada. I. Partata, Wania Aparecida,
orient. II. Título.

Maria do Carmo Quevedo Santos

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NOCICEPTIVO E DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR
CONSTRIÇÃO CRÔNICA GRADUAL NO NERVO ISQUIÁTICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: 19 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. LUCIANO STÜRMER DE FRAGA - UFRGS

Nome do professor - instituição

PROFA. DRA. ANA HELENA DA ROSA PAZ - UFRGS

Nome do professor - instituição

PROFA. DRA. WANIA APARECIDA PARTATA - UFRGS

Nome do professor - instituição (orientador)

RESUMO

A dor neuropática (dor devido a uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial) afeta 6-10% da população mundial e reduz significativamente a qualidade de vida das pessoas acometidas por ela. Apesar de muitos avanços, ainda se desconhece os mecanismos envolvidos na codificação e transmissão da dor neuropática. Os estudos que buscam compreender esses mecanismos utilizam, em sua maioria, modelos animais. Um estudo prévio criou o modelo intitulado dor neuropática graduada, no qual quatro amarrações são realizadas em torno do nervo isquiático de ratos. Porém, a amarração é gradativa e realizada em animais diferentes, e os fios não amarrados são deixados no espaço subcutâneo. Esse modelo mimetiza a variação dolorosa observada nos pacientes com dor neuropática. No modelo, o número de amarrações se relacionou com a diminuição no limiar mecânico e com a ativação de células gliais na medula espinal de ratos. Os estudos mostram que células gliais ativadas liberam espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais desempenham papel importante na dor crônica. Contudo, é desconhecido se a formação de ROS se relaciona com o número de amarrações no modelo de dor neuropática graduada. Assim, este estudo avaliou a formação de ânion superóxido (SAG), uma ROS, os tióis totais, um antioxidante, e a capacidade antioxidante total (TAC) na medula espinal lombossacral de ratos com dor neuropática induzida por constrição gradual no nervo isquiático. Foram também avaliadas as sensibilidades mecânica e térmica e o índice funcional do nervo isquiático (SFI), a primeira para validação do modelo e as demais por serem testes comumente utilizados para avaliação da condição dolorosa em ratos. Após aprovação ética (#27548), ratos *Wistar* machos, pesando entre 200-300g, foram divididos em 6 grupos experimentais (n=6/grupo): Controle (animais não submetidos à manipulação cirúrgica); *Sham* (animais que sofreram incisão dos tecidos até a visualização do nervo isquiático); NOS4 (ratos sem amarradura no nervo isquiático, mas com 4 segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita); N1S3 (ratos com 1 amarradura no nervo isquiático e 3 segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita); N2S2 (ratos com 2 amarraduras no nervo isquiático e 2 segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita); N4S0 (ratos com 4 amarraduras no nervo isquiático e nenhum segmento de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita). Esses ratos foram submetidos aos testes de von Frey eletrônico, da placa quente e da marcação das patas antes da cirurgia (pré-lesão) e aos 3, 5, 7 e 10 dias após o procedimento cirúrgico para avaliação das sensibilidades mecânica e térmica e do SFI, respectivamente. Aos 3 e 10 dias, os ratos foram mortos por decapitação para obtenção do segmento lombossacral da medula espinal, usado para a determinação de SAG, tióis totais e TAC. Os parâmetros nociceptivos foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, e os oxidativos por ANOVA de duas vias (fatores: lesão e tempo), seguidos do pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). A correlação de Pearson foi calculada entre os valores de von Frey e a SAG e tióis totais, no período 3 dias. A redução no limiar mecânico se relacionou com o número de amarrações, o que não ocorreu no limiar térmico e no SFI. Nesses, uma possível relação se deu apenas entre os percentuais de diminuição. A SAG aumentou e os valores de tióis totais diminuíram, e as mudanças correlacionaram-se com o número de amarrações. A TAC não foi alterada nesse modelo. Assim, os resultados mostram a reprodução do modelo. O limiar térmico e o SFI parecem relacionar-se com o número de amarrações. Por sua vez, a SAG e os tióis totais também se relacionam com esse número.

Palavras-chave: dor neuropática graduada, nocicepção, ânion superóxido, tióis totais, capacidade antioxidante total, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Neuropathic pain (pain due to an injury or disease affecting the somatosensory system) affects 6-10% of the world population and significantly reduces the quality of life of people affected by it. Despite many advances, the mechanisms involved in neuropathic pain are still unknown. Most of the studies designed to understand these mechanisms use animal models. A previous study created a model named graded neuropathic pain, in which four chronic gut sutures are placed around the sciatic nerve of rats. However, sutures are graded and performed on different animals, and untied sutures are left in the subcutaneous space. This model mimics the pain variation observed in patients with neuropathic pain. In this model, the number of sutures was related to a decrease in mechanical threshold and activation of glial cells in spinal cord. A number of studies have shown that activated glial cells release reactive oxygen species (ROS), which plays an important role in chronic pain. However, it is unknown if ROS formation is related to the number of sutures in graded neuropathic pain model. Thus, this study evaluated superoxide anion generation (SAG), a ROS, total thiols, an antioxidant, and total antioxidant capacity (TAC) in lumbosacral spinal cord of rats with neuropathic pain induced by gradual constriction of the sciatic nerve. Mechanical and thermal thresholds and the sciatic functional index (SFI) were also evaluated, the former to confirm the reproducibility of the model and the others because they are tests commonly used to evaluate painful conditions in rats. After ethical approval (#27548), male Wistar rats weighing 200-300g were divided into 6 experimental groups (n= 6/group): Control (rats which did not undergo surgical manipulation); Sham (animals which were submitted to tissues incision); N0S4 (rats with no suture around the sciatic nerve and 4 chronic gut placed subcutaneously in right paw); N1S3 (rats which had 1 chronic gut suture around the sciatic nerve and 3 chronic gut placed subcutaneously in right paw); N2S2 (rats which had 2 chronic gut suture around the sciatic nerve and 2 chronic gut placed subcutaneously in right paw); N4S0 (rats which had 4 chronic gut suture around the sciatic nerve and no chronic gut placed subcutaneously). Rats were submitted to the electronic von Frey, hot plate and paw marking tests just before the surgery (pre-injury) and at 3, 5, 7 and 10 days after the surgical procedure to evaluate the mechanical and thermal thresholds and SFI, respectively. At days 3 and 10, rats were decapitated and lumbosacral spinal cord used for determination of SAG, total thiols and TAC. Nociceptive parameters were analyzed by repeated-measures ANOVA and oxidative parameters by two-way ANOVA (factors: injury and time), followed by Tukey's post-test ($P < 0.05$). Pearson's correlation was calculated between von Frey, SAG and total thiols at day 3. Mechanical was threshold reduced and related to the number of sutures, which did not occur for thermal threshold and SFI. In these, a possible relation occurred only in percentages of decrease. SAG increased and total thiols decreased, and the changes were correlated with the number of sutures. TAC did not change in this model. Thus, there was a replication of the model. Thermal threshold and SFI seem to be related to number of sutures. In turn, SAG and total thiols are also related to this number.

Keywords: graded neuropathic pain, nociception, superoxide anion, total thiols, capacity antioxidant total, stress oxidative.

LISTA DE FIGURAS

Introdução:

- Figura 1 – Redução do oxigênio molecular até a formação de água pela ação de enzimas NADPH oxidases e da fosforilação oxidativa..... 10
- Figura 2 – Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinal lombar, Ilustrando a formação do nervo isquiático 12
- Figura 3 – Esquema da pata posterior de um rato mostrando o número de nós em torno do nervo isquiático e os segmentos de fios de sutura deixados livres no espaço subcutâneo da pata, conforme modelo de dor neuropática graduada desenvolvido por GRACE et al (2010).....13

Manuscrito:

- Figura 1 - Medidas das sensibilidades mecânica e térmica em ratos sem e com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático.....46
- Figura 2 - Índice Funcional do Nervo Isquiático e percentual de redução desse Índice em ratos sem e com dor neuropática por constrição gradual no nervo Isquiático.....47
- Figura 3 - Medida da capacidade antioxidante total no segmento lombossacral da medula espinal em ratos sem e com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático nos períodos 3 e 10 dias após a lesão.....48
- Figura 4 - Medida da geração de ânions superóxido (SAG) e da correlação entre as respostas ao teste de von Frey e a SAG aos 3 dias após a lesão nervosa periférica.....49
- Figura 5 - Medida da concentração de tióis totais e da correlação entre as respostas ao teste de von Frey e tióis totais aos 3 dias após a lesão nervosa periférica.....50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....	8
1.1	JUSTIFICATIVA.....	155
1.2	OBJETIVOS.....	16
1.2.1	Objetivo geral.....	16
1.2.2	Objetivos específicos.....	16
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	18
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A – APROVAÇÃO ÉTICA	57
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH.....	59

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

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. 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).

Ao se estudar dor é necessário distinguir os termos dor e nocicepção. A dor é a percepção de sensações como irritação, ardência, inflamação ou latejar, geralmente sensações que são provenientes de alguma parte do corpo e constituem uma sensação de caráter subjetivo e, portanto, relacionada somente aos humanos, que possuem capacidade de verbalizá-la (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 nocicepção, por sua vez, 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).

A dor geralmente 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).

A dor pode ser classificada quanto: a sua natureza (nociceptiva, inflamatória ou neuropática), a sua duração (aguda ou crônica), a sua intensidade (leve, moderada ou severa), entre outros. Para atender os propósitos desse estudo será destacada a dor neuropática.

A dor neuropática é aquela decorrente de lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial (COLLOCA et al., 2017; NICKEL et al., 2012). Ela ocorre devido a traumas mecânicos (secção ou constrição de nervo periférico, lesões no SNC), doenças metabólicas (como diabetes) ou nutricionais, alcoolismo, uso de fármacos, exposição a toxinas, neoplasias, lesões vasculares, entre outros (BARON; BINDER; WASNER, 2010). Tanto o sistema nervoso periférico quanto o central podem ser acometidos por essas lesões, o que caracteriza a dor neuropática em periférica ou central, respectivamente (COLLOCA et al., 2017; NICKEL et al., 2012).

A dor neuropática reduz significativamente a qualidade de vida das pessoas acometidas por ela e frequentemente 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 sublimiáveis). 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).

Diversos mediadores químicos contribuem para a sensibilização (COLLOCA et al., 2017; VON HEHN et al., 2012; NICKEL et al., 2012; BASBAUM et al., 2009; MOSLEY et al., 2006; ZIMMERMANN, 2001; MILLAN, 1999). Dentre esses será destacada a produção de espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive oxygen species* - ROS), por seu papel importante no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (GEIS et al., 2017; GRACE et al., 2016; KIM, H. K. et al., 2004).

A formação de ROS ocorre em virtude dos processos do metabolismo energético celular (Figura 1). O processo de fosforilação oxidativa mitocondrial e de enzimas 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). Existem também moléculas que podem contribuir para aumento na formação de ROS, como exemplo

o óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) (POLJSAK et al., 2013). O NO é formado pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), que catalisam a oxidação da arginina para a formação de NO (DROGE, 2002; GRACE et al., 2016). Os efeitos citotóxicos e a nitração de proteínas são ocasionados principalmente por meio dos produtos secundários do NO, como o peroxinitrito (ONOO^-), formado pela reação rápida do NO com $\text{O}_2^{\bullet-}$ (HALLIWELL, 2012). O H_2O_2 e o ONOO^- podem também gerar radical OH^\bullet , que atua na peroxidação de lipídeos e proteínas, e oxidação de ácidos nucleicos (GRACE et al., 2016; HALLIWELL, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

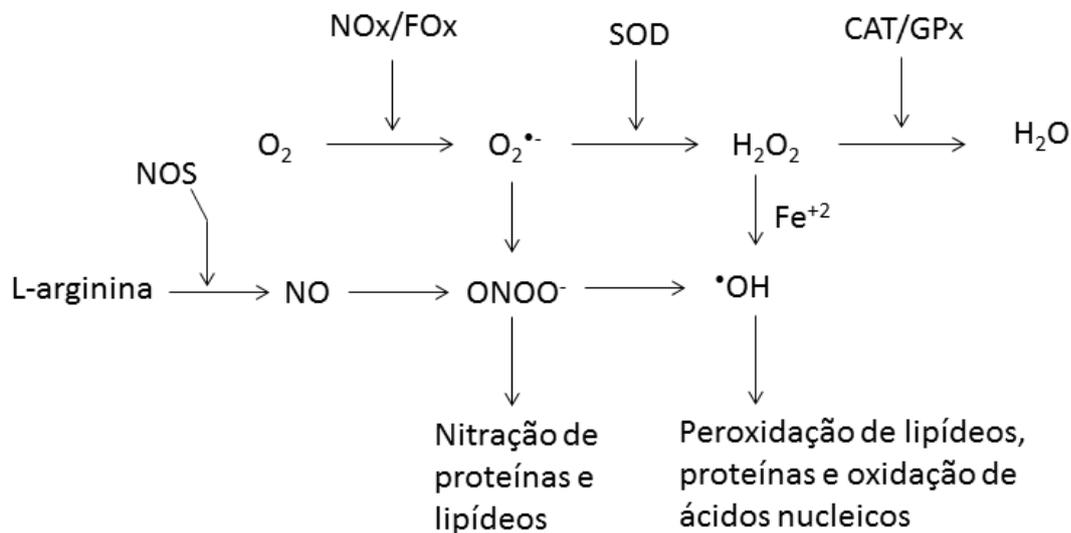


Figura 1 – Redução do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O) pela ação de enzimas NADPH oxidases (NOx) e da fosforilação oxidativa (FOX). No esquema é mostrada a formação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), de radical hidroxil (OH^\bullet) e de peroxinitrito (ONOO^-), assim como a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). No esquema ainda é mostrada a formação de óxido nítrico (NO) pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Adaptado de Grace et al., 2016).

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.

Para regular a produção e dispersão das ROS, as células contam com sistemas de defesas antioxidantes, constituídos por componentes enzimáticos e não enzimáticos (POLJSAK et al., 2013). Dentre as primeiras linhas de defesas antioxidantes enzimáticas está a superóxido dismutase (SOD, do inglês *superoxide dismutase*), que catalisa a conversão de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . O H_2O_2 proveniente da ação da SOD ou de outras fontes pode ser eliminado pela ação das enzimas catalase ou peroxidases (FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Entre os antioxidantes não enzimáticos, destaca-se o ácido ascórbico, a glutathiona (GSH) e o alfa-tocoferol. Para os propósitos desse trabalho será destacada a GSH, um tripeptídeo capaz de reduzir e regenerar várias moléculas oxidadas, atuando também como um eficiente *scavenger* de ROS e de $ONOO^-$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

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 $O_2^{\bullet-}$ e do $ONOO^-$ 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). Outro parâmetro que sabidamente está alterado na dor neuropática é a GSH, que é reduzida nessa condição (BHAT et al., 2016; NAIK et al., 2006). As ROS também parecem atuar como fatores importantes na regulação da atividade do receptor de glutamato do tipo ionotrópico NMDA (N-metil-D-aspartato). Esse receptor possui papel fundamental na sensibilização que ocorre em condições dolorosas, e possui sítios regulatórios que respondem a mudanças nas condições de oxirredução (KIM et al., 2004; VINCENT et al., 2017). Frente a acréscimos na formação de $ONOO^-$, esta molécula pode se ligar de forma irreversível ao receptor NMDA. Essa ligação resulta em aumento no influxo de cálcio para o meio intracelular, o que pode levar a um quadro de excitotoxicidade glutamatérgica (BECKHAUSER; FRANCIS-OLIVEIRA; PASQUALE, 2016; CHOI; LIPTON, 2000; GRACE et al., 2016; SALVEMINI; NEUMANN, 2009). A ativação dos receptores NMDA também aumenta a produção de ROS (COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015; MELLER; GEBHART, 1993).

Nos estudos da dor neuropática, as principais informações sobre participação das ROS vêm de estudos empregando modelos animais, especialmente roedores. Como informado anteriormente, esses animais não possuem capacidade de verbalizar sua percepção do estímulo doloroso, mas exibem respostas motoras similares às dos humanos quando em

contato com estímulos nociceptivos, o que permite inferir a existência de nocicepção (DUBNER, 1983; KAVALIERS, 1988). Existem diferentes modelos animais para o estudo da dor neuropática (JAGGI et al., 2011). Um modelo muito usado é o da constrição crônica no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), também referido como ligadura constritiva crônica no nervo isquiático (Figura 2). Esse modelo consiste em quatro amarraduras no tronco comum do nervo isquiático. Em virtude da lesão nervosa, diversos mediadores inflamatórios são produzidos localmente e atuam tanto no local da lesão como no SNC. Estes mediadores contribuem para os sinais característicos da dor neuropática, como a hiperalgesia e a alodinia (COLLOCA et al, 2017; VON HEHN et al, 2012; NICKEL et al, 2012; BASBAUM et al., 2009; MOSLEY et al., 2006; ZIMMERMANN, 2001; MILLAN, 1999).

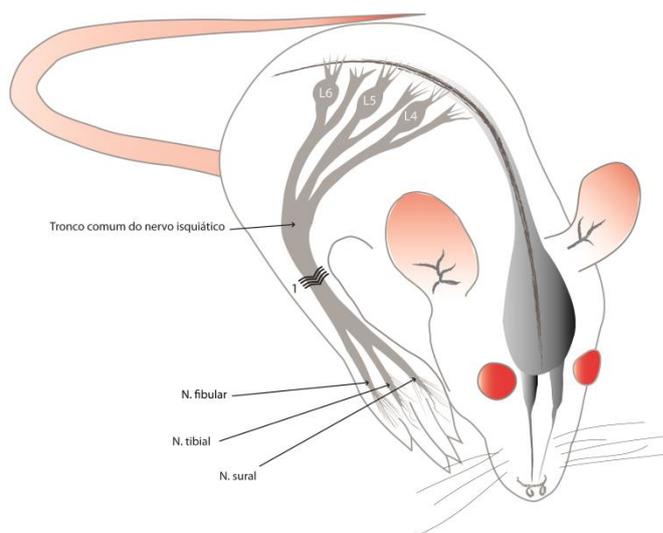


Figura 2 – Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinal lombar, ilustrando a formação do nervo isquiático. Nas raízes dorsais do nervo isquiático estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5, L6) desse nervo, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente 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.

Porém, o modelo CCI determina praticamente o mesmo grau de constrição nervosa nos ratos com lesão nervosa. Além disso, os resultados experimentais dos ratos com lesão nervosa são comparados com dados obtidos em ratos que não sofreram qualquer manipulação cirúrgica e/ou tiveram somente lesão tecidual. Na clínica médica, a sensibilidade dolorosa de pacientes com dor neuropática é variável, se mostrando de grau médio a severo (COLLOCA et al, 2017). Para tentar mimetizar a variabilidade observada na clínica, desenvolveu-se o modelo intitulado dor neuropática graduada (GRACE et al., 2010). Segundo Grace et al., a lesão nervosa é induzida por constrição no nervo isquiático, mas o número de amarraduras em torno do nervo varia de zero a quatro, e os fios não amarrados são deixados no espaço subcutâneo da pata (Figura 3). No modelo há ainda o rato que recebe apenas 4 segmentos do

fio de sutura no espaço subcutâneo da pata, a fim de determinar a contribuição do processo inflamatório desencadeado pela presença do fio de sutura. De acordo com Grace et al. (2010), por variar o número de amarrações em torno do nervo isquiático, o modelo de dor neuropática graduada se aproxima mais da condição observada na clínica, onde se observa ampla variabilidade na dor neuropática relatada pelos pacientes.

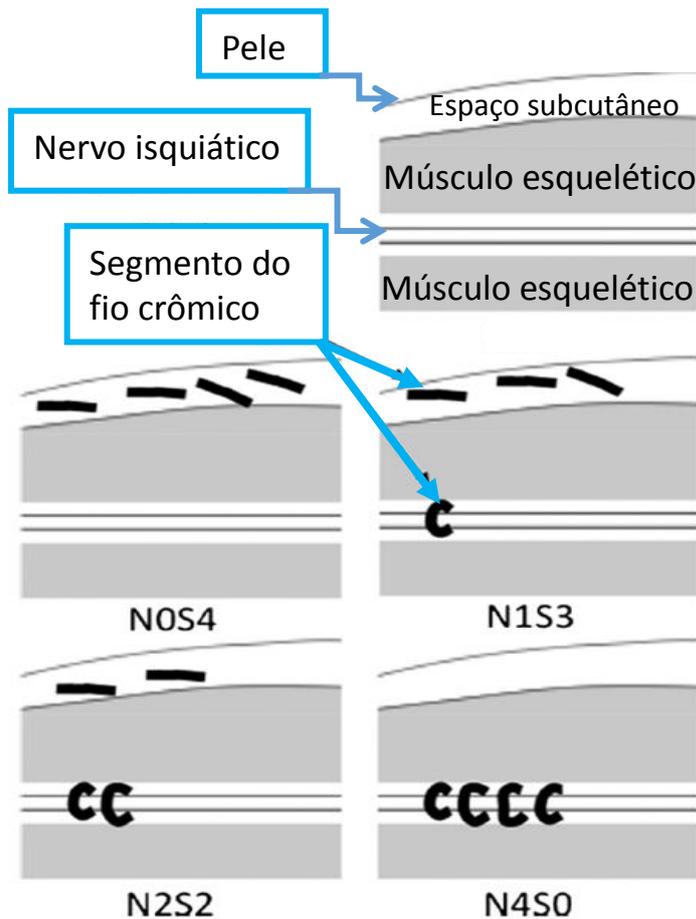


Figura 3 – Esquema da pata posterior de um rato mostrando o número de nós (N) em torno do nervo isquiático e os segmentos de fios de sutura deixados livres no espaço subcutâneo (S) da pata, conforme modelo de dor neuropática graduada desenvolvido por GRACE et al (2010). N0S4: nenhuma amarradura em torno do nervo e 4 fios no espaço subcutâneo; N1S3: uma amarradura em torno do nervo e 3 fios no espaço subcutâneo; N2S2: duas amarraduras em torno do nervo e 2 fios no espaço subcutâneo; N4S0: quatro amarraduras em torno do nervo e nenhum fio no espaço subcutâneo (adaptado de Grace et al, 2010).

Em ratos com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático, observou-se que o aumento no número de amarrações em torno do nervo isquiático provocou acréscimo na sensibilidade mecânica a estímulo inócua (alodinia) (GRACE et al., 2010). Nesse estudo, os ratos com 4 amarrações em torno do nervo isquiático tiveram as maiores reduções no limiar de sensibilidade mecânica, seguido dos ratos com 2 amarrações e dos ratos com 1 amarração, esse último exibindo a menor redução no limiar mecânico dentre os ratos com amarrações no nervo. Ainda, no estudo foi observado que os ratos com 4 amarrações em torno do nervo isquiático exibiram redução na sensibilidade mecânica que foi similar a que se observa em ratos com CCI.

A redução gradual no limiar de sensibilidade mecânica ocorreu tanto em animais machos quanto em fêmeas (NICOTRA et al., 2014). No modelo de dor neuropática graduada se observou ainda ativação gradual de células gliais no corno dorsal e funículo dorsolateral da medula espinal (GRACE et al., 2010). Nesse estudo, o aumento gradual no limiar de sensibilidade mecânica se correlacionou significativamente com o acréscimo na imunorreatividade ao marcador de microglia CDI 1b no corno dorsal ipsilateral da medula espinal. Apesar de não significativo, os autores também observaram aumento na imunorreatividade à proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *glial fibrillary acidic protein*), um marcador de ativação de astrócitos, no corno dorsal da medula espinal, e esse aumento também estava relacionado com o número de amarraduras em torno do nervo isquiático.

Os estudos mostram que as células da glia localizadas na medula espinal, especialmente as células microglicais, modulam a sensibilização central (TANG et al., 2017; HOSSAIN et al., 2017; HUANG et al., 2017; MEACHAM et al., 2017; ZHANG et al., 2016; AMIN et al., 2015; GRACE et al., 2014). É sabido ainda que a microglia ativada libera citocinas inflamatórias, fatores neurotróficos, prostaglandinas e ROS, as quais excitam neurônios nociceptivos da medula espinal e, assim, contribuem para a persistência da dor crônica (VALVERDE et al., 2016; YANHU et al., 2014). Como ratos com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático exibiram ativação gradual em células da glia (microglia e astrócitos) na medula espinal (GRACE et al., 2010), é possível que também ocorra alteração graduada em parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal desses ratos. Porém, essa questão ainda não foi avaliada em ratos com dor neuropática graduada. Do mesmo modo, ainda se desconhece a resposta de ratos com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático aos testes da placa quente e da marcação das patas, os quais normalmente são usados junto com o teste de avaliação do limiar de sensibilidade mecânica nos estudos de nocicepção em ratos com CCI (HORST et al., 2014, RIFFEL et al., 2016; GOECKS et al., 2012, SHAHID et al., 2017, FARGHALY et al., 2016). Portanto, a motivação para a realização do presente estudo foi não apenas reproduzir o modelo de dor neuropática graduada em nosso laboratório de pesquisa, mas também fornecer respostas às questões acima apresentadas.

1.1 JUSTIFICATIVA

Um dos tipos de dor é a neuropática, que é a dor desencadeada por lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial. Esse tipo de dor reduz significativamente a qualidade de vida das pessoas acometidas por ela e frequentemente está associada à ansiedade, depressão e distúrbios de sono. Os estudos mostram que em condições de dor neuropática há aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e alterações em sistemas de antioxidantes, sistemas estes que atuam limitando a ação de ROS.

Para compreender o papel das ROS na dor neuropática se utilizam modelos animais em condição que sabidamente induz esse tipo de dor, sendo um desses modelos o de lesão por constrição crônica no nervo isquiático. Nesse modelo, quatro amarrações são feitas em torno do nervo de um rato para induzir dor. Os resultados são comparados com aqueles obtidos em ratos que não sofreram qualquer manipulação cirúrgica e/ou tiveram somente lesão tecidual. Como a sensibilidade dolorosa em humanos com dor neuropática varia de grau médio a severo, Grace et al (2010) desenvolveram o modelo de dor neuropática graduada, no qual ratos recebem quatro amarrações no nervo isquiático, mas o número de amarrações varia de zero a quatro em diferentes ratos, e os segmentos do fio de sutura não amarrados são deixados no espaço subcutâneo da pata.

No modelo de dor neuropática graduada, o limiar de sensibilidade mecânica e a ativação de células da glia na medula espinal variaram de acordo com o número de amarrações em torno do nervo. É sabido que células da glia ativadas liberam diversos mediadores químicos, dentre esses ROS. Assim, postulou-se que em condição de dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático ocorreriam alterações graduais na formação de ânion superóxido, uma ROS, tióis totais, um antioxidante, e capacidade antioxidante total na medula espinal lombossacral, a região de entrada de informações aferentes do nervo isquiático. Ainda, postulou-se que o número de amarrações em torno do nervo isquiático se relacionaria gradualmente com as respostas de ratos aos testes da placa quente e da marcação das patas, os quais normalmente são usados para avaliar respostas sensoriais nos estudos de nocicepção. Assim, a motivação para a realização do presente estudo foi reproduzir o modelo de dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático em nosso laboratório de pesquisa e avaliar as hipóteses anteriormente expostas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar parâmetros: (1) nociceptivos, como sensibilidades mecânica e térmica e índice funcional do nervo isquiático, e (2) de estresse oxidativo, como formação de ânions superóxido, valores de tióis totais e capacidade antioxidante total, no segmento lombossacral da medula espinal de ratos com dor neuropática induzida por constrição gradual no nervo isquiático, um modelo novo de dor neuropática.

1.2.2 Objetivos específicos

1) Determinar parâmetros nociceptivos a fim de: (a) comprovar a eficácia da lesão, e (b) demonstrar os efeitos da dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático sobre a sensibilidade térmica e o índice funcional do nervo isquiático, medidas ainda desconhecidas no modelo. Para isso foram empregados:

- Teste de von Frey eletrônico, para avaliar a sensibilidade mecânica nos períodos 0 (pré-lesão), 3, 5, 7 e 10 dias após a intervenção cirúrgica, a fim de reproduzir o modelo;
- Teste da placa quente, para avaliar a sensibilidade térmica nos períodos 0 (pré-lesão), 3, 5, 7 e 10 dias após a intervenção cirúrgica;
- Teste de marcação das patas, para avaliar a recuperação do índice funcional do nervo isquiático (IFI) nos períodos 0 (pré-lesão), 3, 5, 7 e 10 dias após a intervenção cirúrgica.

2) Avaliar parâmetros de estresse oxidativo no segmento lombossacral da medula espinal de ratos sem e com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático, mediante determinação de:

- Capacidade antioxidante total (TAC do inglês *capacity antioxidant total*), conforme a técnica descrita por Erel et al., 2004.
- Formação de ânions superóxido (SAG do inglês *superoxide-anions generation*), conforme a técnica descrita por Wang et al., 2004;
- Valores de tióis totais, conforme a técnica descrita por Aksenov; Markesbery, 2001.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo mostrado a seguir será submetido à análise na Revista intitulada *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. As normas para a elaboração do artigo são mostradas no ANEXO A do presente trabalho.

O projeto que antecedeu ao estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (Nº 27548), documento mostrado no APÊNDICE A do presente trabalho. O projeto foi intitulado “**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO NERVO ISQUIÁTICO E DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA GRADUADA**” e incluiu não apenas as medidas apresentadas no presente estudo, mas também outras com o objetivo de fornecer uma visão mais geral sobre os efeitos da dor neuropática graduada em parâmetros de estresse oxidativo, as quais serão avaliadas posteriormente.

Avaliação funcional e de parâmetros oxidativos em medula espinal de ratos com dor neuropática induzida por constrição crônica gradual no nervo isquiático

Maria do Carmo Q. Santos¹, Jéssica A. de Souza¹, Thaisla Cristiane Borella da Silva¹, Ana Paula K. Riffel¹, Adarly Kroth², Andrea Horst³, Wania A. Partata¹

¹Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Área Ciências da Vida, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, SC, Brazil.

³Univates, Lajeado, RS, Brazil.

Título abreviado para cabeça das páginas: Dor neuropática graduada altera gradualmente parâmetros nociceptivo e oxidativos na medula espinal

Correspondência: Maria do Carmo Q. Santos

Departamento de Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: +55 51 3308 3305; fax: +55 51 3308 3166

E-mail: mahquevedo@gmail.com

Resumo

Este estudo avaliou as sensibilidades mecânica e térmica e o índice funcional do nervo isquiático (SFI) em ratos com dor neuropática graduada, um modelo novo de dor neuropática. Foram também avaliados formação de ânion superóxido (SAG), tióis totais e capacidade antioxidante total (TAC) na medula espinal lombossacral, os dois primeiros por desempenharem papel importante em condições de dor neuropática induzida por outros modelos. Ratos Wistar adultos, com peso de 200-250 g, foram divididos nos grupos (n=6/grupo): controle (ratos sem qualquer manipulação cirúrgica); sham (ratos com apenas lesão tecidual na pata direita); N0S4 (ratos sem amarradura no nervo isquiático, mas com 4 segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita); N1S3 (ratos com 1 amarradura no nervo isquiático e 3 segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita); N2S2 (ratos com 2 amarraduras no nervo isquiático e 2 segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita); N4S0 (ratos com 4 amarraduras no nervo isquiático e nenhum segmento de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita). A dor neuropática graduada provocou alterações graduais nos limiares de sensibilidades mecânica e térmica e no SFI. Porém, a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa apenas no limiar mecânico. A SAG aumentou e os valores de tióis totais diminuíram gradualmente, sem qualquer mudança significativa na TAC. Assim, os dados sugerem relação entre número de nós em torno do nervo isquiático e parâmetros funcionais e oxidativos em medula espinal de ratos com dor neuropática graduada.

Palavras chave: Formação de ânion superóxido; Glutathione; Capacidade antioxidante total; Índice funcional do nervo isquiático; Limiar térmico

Introdução

A dor neuropática é aquela decorrente de lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial (1). Esse tipo de dor afeta 6-10% da população mundial e reduz significativamente a qualidade de vida das pessoas acometidas por ela (1,2). 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) (3), as quais caracterizam o quadro de sensibilização, que pode ser periférica ou central (1).

Diversos mediadores químicos contribuem para a sensibilização que se observa na dor neuropática (1,4,5). Dentre esses estão as espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive oxygen species* - ROS). A formação dessas espécies ocorre em virtude dos processos do metabolismo energético celular. O processo de fosforilação oxidativa mitocondrial e de enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases são algumas das fontes endógenas usuais de geração de ROS, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (6-10). Estudos prévios mostraram que o $O_2^{\bullet-}$ se relaciona com dor de diversas etiologias, entre elas a dor neuropática induzida por diferentes modelos experimentais (7-9). Para regular a produção e dispersão das ROS, as células contam com sistemas de defesas antioxidantes. Dentre esses sistemas está a glutatona, um tripeptídeo capaz de reduzir e regenerar várias moléculas oxidadas, atuando também como um eficiente *scavenger* de ROS (11). A glutatona constitui o principal tiol intracelular e está diminuída em condições de dor neuropática por constrição crônica no nervo isquiático (12,13), um dos modelos de indução de dor neuropática em ratos que se caracteriza pela realização de quatro amarraduras em torno do nervo (14).

Um estudo prévio estabeleceu um modelo novo para o estudo da dor neuropática, o modelo intitulado dor neuropática graduada (15). Nesse modelo, a lesão nervosa foi induzida por constrição crônica no nervo isquiático de ratos, mas o número de amarraduras em torno do

nervo variou de zero a quatro em diferentes animais, e os fios não amarrados foram deixados no espaço subcutâneo da pata. De acordo com Grace et al. (15), o modelo de dor neuropática graduada se aproxima mais da condição observada na clínica, onde se observa ampla variabilidade na dor neuropática relatada pelos pacientes.

Em ratos com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático, observou-se que o aumento no número de amarraduras em torno desse nervo provocou acréscimo na sensibilidade mecânica a estímulo inócuo (15). Essa resposta ocorreu tanto em animais machos quanto em fêmeas (16).

No modelo novo de dor neuropática também se observou ativação gradual em células gliais do corno dorsal e funículo dorsolateral da medula espinal (15). É sabido que células da glia, especialmente a microglia, modulam a sensibilização central (17-19). É sabido ainda que a microglia ativada libera citocinas inflamatórias, fatores neurotróficos, prostaglandinas e ROS, as quais excitam neurônios nociceptivos da medula espinal e, assim, contribuem para a persistência da dor crônica (20,21). Porém, ainda é desconhecido se a formação de ROS se relaciona com o número de amarraduras em torno do nervo isquiático no modelo de dor neuropática por constrição gradual nesse nervo. Do mesmo modo, ainda se desconhece os efeitos da dor neuropática graduada sobre a sensibilidade térmica e o índice funcional do nervo isquiático (SFI), os quais normalmente são utilizados também nos estudos de nociceção em ratos (22-26). Assim, este estudo teve como objetivo determinar as sensibilidades mecânica e térmica e o SFI em ratos com dor neuropática graduada. Foram também avaliados a formação de ânion superóxido (SAG), os tióis totais e a capacidade antioxidante total (TAC) na medula espinal lombossacral desses ratos.

Materiais e métodos

Animais experimentais

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS nº 23352). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal e reduzir o número de animais utilizados. Os ratos Wistar machos, adultos, que pesavam 200-250 g, foram divididos em seis grupos experimentais (n=6/grupo), como segue: Controle (ratos sem qualquer manipulação cirúrgica); sham (ratos que tiveram apenas lesão tecidual na pata direita); NOS4 (ratos sem amarradura no nervo isquiático, mas com 4 segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita); N1S3 (ratos com 1 amarradura no nervo isquiático e 3 segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita); N2S2 (ratos com 2 amarraduras no nervo isquiático e 2 segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita); N4S0 (ratos com 4 amarraduras no nervo isquiático e nenhum segmento de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita). Os ratos foram mortos aos 3 e 10 dias após a intervenção cirúrgica.

Indução da dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático

A dor neuropática graduada foi induzida de acordo com o procedimento descrito por Grace et al. (15). Após anestesia ($90 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ cetamina e $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ xilazina), o nervo isquiático direito foi exposto mediante incisão na parte mediana da coxa. Próximo de seu ponto de ramificação, este nervo foi liberado dos tecidos adjacentes por um comprimento de aproximadamente 7 mm, e recebeu em seu tronco comum 0 (nenhuma), 1, 2, 3 ou 4

amarraduras com fio crômico do tipo *catgut* 4.0 (Shalon Fios Cirúrgicos LTDA, São Luis de Montes Belos, Brasil). Os segmentos do fio não amarrados foram deixados no espaço subcutâneo da pata, de acordo com o grupo experimental ao qual pertencia (N0S4, N1S3, N2S2, N4S4). Após o procedimento, a região foi imediatamente suturada com fio de sutura e aplicado no local da cirurgia 01 jato de solução de rifamicina sódica (10 mg/mL) para evitar infecção. Nos ratos do grupo sham, todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados, exceto amarração no nervo isquiático e colocação de segmentos de fio de sutura no espaço subcutâneo da pata direita.

Teste de von Frey eletrônico

Os animais dos diferentes grupos foram testados para determinação do limiar a estímulo mecânico inócuo mediante emprego do teste de von Frey eletrônico. Para isso os ratos foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico (12 × 10 × 17 cm) com tela no fundo, onde permaneceram por 20 minutos para adaptação ao novo ambiente. Em seguida, foi verificado o limiar de resposta da pata ipsilateral à lesão com aparelho de von Frey eletrônico (Insight, Brasil). O procedimento consistiu na aplicação de forças crescentes na região plantar do membro posterior direito do animal. A resposta foi considerada positiva quando o animal realizou o movimento de retirada do membro estimulado durante o teste. Neste momento, a intensidade da pressão exercida foi automaticamente registrada. Porém, se esta resposta foi seguida de caminhada, o teste foi refeito e a resposta desconsiderada. O teste foi realizado antes do procedimento cirúrgico (0) e aos 3, 5, 7 e 10 dias após a cirurgia, sempre pela manhã, em local silencioso, e pelo mesmo pesquisador. Em cada rato, o teste foi repetido cinco vezes, uma vez a cada 5-10 s, sempre na pata ipsilateral à lesão. A média das cinco leituras foi considerada o limiar de resposta para o animal. Os resultados foram expressos como média ±

erro padrão da média da pressão medida quando o rato ergueu sua pata em resposta ao estímulo mecânico inócuo.

Teste da placa quente

Os animais dos diferentes grupos foram testados para determinação do limiar a estímulo térmico mediante emprego do teste da placa quente. Neste teste, cada rato foi inicialmente aclimatado à placa em temperatura ambiente por um período de 15 minutos. Após este procedimento, a placa foi aquecida e mantida à temperatura de 50 °C. Nessa temperatura, cada rato foi colocado sobre a placa quente e o tempo para o reflexo de retirada de qualquer uma das patas foi verificado e anotado. Assim que o rato manifestou a ação de erguer qualquer pata, este foi imediatamente retirado do contato com a placa quente para evitar lesão tecidual. O teste foi realizado antes do procedimento cirúrgico (0) e aos 3, 5, 7 e 10 dias após a cirurgia, nas mesmas condições descritas no teste de von Frey eletrônico. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média do tempo de latência para a retirada da pata.

Índice funcional do nervo isquiático (SFI, do inglês *sciatic functional index*)

O SFI foi determinado pelo teste da marcação das patas (do inglês, *walking track analysis*), descrito por De Medinacelli (27) com algumas modificações (23,28). No teste, o animal foi colocado em um corredor de madeira (8,5x100 cm) com acesso a um ambiente escuro. O chão do corredor foi forrado com uma tira de papel branco de 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. Todos os animais foram anteriormente

treinados com três passagens pelo corredor, permitindo a adaptação e exploração do local. As marcas das pegadas com qualidade e clareza de impressão foram usadas para determinar os seguintes parâmetros: extensão da pegada (distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), largura da pegada (distância entre o 1º e 5º dedo), e distância entre os dedos intermediários (2º e 4º dedo) das patas traseiras. Estas três medidas foram obtidas das patas normal (N) e lesionada (E). Foram obtidas diversas impressões das patas N e E durante a passagem do rato pelo corredor em direção ao compartimento escuro localizado na outra extremidade, mas apenas 3 impressões de cada uma das patas foram utilizados para calcular a média das medidas descritas acima. O SFI foi calculado conforme a fórmula:

$$SFI = -38,3 [(EPL-NPL)/NPL] + 109,5 [(ETS-NTS)/NTS] + 13,3 [(EIT-NIT)-NIT] - 8,8$$
 onde N= pata sem lesão; E: pata lesionada; PL= distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo (extensão da pegada); TS: distância entre o 1º e 5º dedo (largura da pegada); IT: 2º e 4º dedo (distância entre os dedos intermediários).

O resultado foi considerado como um índice da condição funcional do nervo isquiático, onde o zero (± 11) representou função normal e -100 representou perda total da função. Os valores intermediários corresponderam a déficits parciais de função. O teste foi realizado antes do procedimento cirúrgico (0) e aos 3, 5, 7 e 10 dias após a cirurgia, nas mesmas condições descritas no teste de von Frey eletrônico. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média dos valores obtidos nas avaliações das marcas das patas.

Preparação das amostras

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação. Imediatamente após a decapitação de cada rato, foi retirado o segmento lombossacral da medula espinal, que foi dividido em duas partes. Uma das partes foi homogeneizada para

dosagem dos tióis totais e TAC. A homogeneização 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. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70 °C (Buege & Aust, 1987). A outra parte da amostra foi utilizada para a determinação da SAG, sendo congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas intacta à temperatura de -70 °C.

Determinação da TAC

A TAC foi determinada com 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{*+}), o qual em um meio ácido é descolorido por antioxidantes presentes na amostra (29). A velocidade da reação foi calibrada com Trolox, utilizado como um padrão para os ensaios de medição tradicional de capacidade antioxidante. Os resultados foram expressos em nanomol·equivalente trolox⁻¹·g tecido⁻¹.

Determinação da SAG

A SAG foi estimada pela redução de azul de nitrotetrazol (NBT), conforme técnica descrita por Wang et al. (30). O método consistiu na reação dos homogeneizados com NBT por 90 minutos, para formação de formazan, um indicador de O₂^{•-}. A absorvância do formazan foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. A quantidade de formazan reduzido pelo O₂^{•-} foi calculada pela fórmula:

Redução a formazan = $A \times V / (T \times Wt \times \epsilon \times l)$, onde A representa a absorvância do formazan, V o volume de solução, T o período de incubação das amostras com NBT, Wt o peso do tecido, ϵ o coeficiente de extinção molar (0,72 L.mmol⁻¹.mm⁻¹), e l representa o caminho óptico. Os resultados foram expressos em picomol·minuto⁻¹·miligrama de peso do tecido.

Determinação de tióis totais

Os valores de tióis totais foram determinados como descrito por Aksenov & Markesbery (31). Resumidamente, 30 μ L de uma amostra foram misturados com 1 mL de tampão fosfato/EDTA (pH = 7,5) e 30 μ L de ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB, 10 mM). Amostras controle, sem DTNB, correram simultaneamente. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 412 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Os resultados foram expressos em mmol/mg de tecido.

Análise estatística

Os resultados são mostrados como média \pm SEM dos valores de 6 animais. Os resultados dos testes de von Frey, da placa quente e do SFI foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Tukey. Os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo foram analisados por ANOVA de duas vias (fatores: lesão e tempo), seguido do pós-teste de Tukey. Foi ainda calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre os parâmetros oxidativos (SAG e os tióis totais) e as respostas ao teste de von Frey, considerando o período 3 dias. Em todos os testes foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o valor de *P* foi <0,05. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Sigma Stat 3.5.

Resultados

Parâmetros comportamentais

Como já descrito na literatura (15), as respostas ao teste de von Frey diminuíram com a constrição em torno do nervo isquiático, e a redução se relacionou com o número de amarraduras (Figura 1A). A redução foi aproximadamente 48% no grupo N1S3, 58% no grupo N2S2 e 75% no grupo N4S0, comparado ao valor obtido no dia 0 (pré-lesão) e aos valores dos grupos controle, sham e N0S4. A diminuição já estava presente aos 3 dias e se manteve nos períodos de 5, 7 e 10 dias após a cirurgia. Nenhuma alteração significativa foi encontrada nos ratos dos grupos N0S4, sham e controle.

A latência de retirada da pata também foi reduzida nos ratos N1S3, N2S2 e N4S0. Apesar de a redução ser significativa apenas no grupo N4S0, pode-se observar relação entre o número de amarraduras e a diminuição no limiar térmico quando se calculou os percentuais de mudanças nos grupos com lesão nervosa (Figura 1B). A redução foi aproximadamente 42% no grupo N4S0, mas 31% no grupo N2S2 e 23% nos grupos N1S3 e N0S4. Contudo, a redução no grupo N1S3 foi observada nos dias 3, 5, 7 e 10 dias após a constrição nervosa, mas apenas nos dias 7 e 10 nos ratos do grupo N0S4. Nenhuma alteração significativa foi encontrada nos ratos dos grupos sham e controle.

Os valores do SFI nos animais dos grupos controle, sham e N0S4 ficaram próximos de zero em todos os períodos experimentais, o que indica funcionalidade normal do nervo isquiático (Figura 1A). Os valores também foram próximos a zero quando o teste da marcação das patas foi realizado antes da lesão (pré-lesão) nos ratos submetidos posteriormente à constrição gradual no nervo isquiático. Após a lesão nervosa, todos os ratos tiveram redução significativa no SFI. Os valores encontrados foram cerca de -60 nos ratos N1S3, -70 nos ratos N2S2, e -80 nos ratos N4S0, o que indica perda de funcionalidade no nervo isquiático e sugere relação entre esse parâmetro e o número de amarraduras em torno do nervo. Considerando o valor pré-lesão do grupo experimental, a redução nos valores do SFI foi aproximadamente 60% no grupo N1S3, 70% no grupo N2S2 e 80% no grupo N4S0. A Figura

2B mostra o percentual de redução no SFI nos grupos experimentais N1S3, N2S2 e N4S0, considerando o valor pré-lesão do grupo experimental como 100%. A redução no SFI nos grupos com constrição nervosa ocorreu aos 3, 5, 7 e 10 dias, o que sugere ausência de recuperação da funcionalidade do nervo nesses períodos.

Parâmetros oxidativos

A TAC não mostrou interações estatisticamente significativas na medula espinal lombossacral de ratos sem e com dor neuropática graduada nos períodos experimentais considerados no estudo ($F= 0,552$, $P> 0,05$) (Figura 3).

Uma interação significativa entre grupo e tempo ocorreu na SAG ($F= 5,682$, $P< 0,001$). A SAG estava aumentada nos grupos com constrição gradual no nervo isquiático (Figura 4A). Aos 3 dias após a constrição nervosa, o aumento foi 56% no grupo N1S3, 81% no grupo N2S2, e 159% no grupo N4S0, comparado ao grupo controle desse período. A correlação entre a SAG e as respostas ao teste de von Frey aos 3 dias foi estatisticamente significativa (Figura 4B). Apesar de não significativo, a SAG estava ainda aumentada na medula espinal dos ratos com constrição nervosa aos 10 dias após a intervenção cirúrgica (Figura 4A). O aumento foi 29% no grupo N1S3, 32% no grupo N2S2 e 56% no grupo N4S0, comparado ao valor do grupo controle do mesmo período. Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi encontrada nos grupos controle, sham e N0S4 nos períodos considerados no estudo. Porém, quando os grupos sham e N0S4 foram comparados ao grupo controle, observou-se um acréscimo de aproximadamente 12% na SAG nos grupos sham e N0S4, tanto aos 3 como aos 10 dias.

Para os tióis totais, a interação foi significativa somente para o grupo ($F= 15,169$, $P<0,001$). Os valores de tióis totais reduziram na medula espinal dos ratos com lesão nervosa,

e essa alteração também se relacionou com o número de amarraduras em torno do nervo (Figura 5A). Aos 3 dias, os tióis totais estavam significativamente reduzidos na medula espinal dos grupos N2S2 (43%) e N4S0 (76%), comparado ao valor do grupo controle do período. No grupo N1S3, a diminuição foi 21% comparado ao valor do grupo controle. A correlação entre os valores de tióis totais e as respostas ao teste de von Frey aos 3 dias foi estatisticamente significativa (Figura 5B). Aos 10 dias, a redução nos tióis totais foi 43%, 67% e 11% nos grupos N2S2, N4S0 e N1S3, respectivamente. Não houve alterações estatisticamente significativas nos grupos controle, sham e N4S0.

Discussão

O presente estudo mostrou que a constrição gradual no nervo isquiático reduziu significativamente os limiares mecânico e térmico e o SFI nos ratos lesionados. Paralelamente a essas alterações se observou aumento na SAG e diminuição dos valores de tióis totais na medula espinal lombossacral dos ratos com lesão nervosa, sem mudar significativamente os valores da TAC nesse tecido.

A redução no limiar de sensibilidade mecânica nos grupos N1S3, N2S2 e N4S0 se relacionou com o número de amarrações em torno do nervo isquiático, tal como foi demonstrado por Grace et al. (15). Assim, o modelo de dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático usado no presente estudo reproduziu os dados da literatura. Como a diminuição nos limiares mecânico e térmico, e do SFI, nos ratos N4S0 foi similar ao observada no modelo de dor neuropática por constrição crônica no nervo isquiático (22, 23, 24, 28), pode-se sugerir também que nesse grupo as alterações sensoriais foram condizentes com as de um quadro de dor neuropática induzida por amarração de 4 fios em torno do nervo isquiático.

Pela primeira vez se demonstrou as respostas de ratos com dor neuropática graduada ao teste da placa quente, uma medida do limiar térmico. Nos ratos do grupo N4S0, a redução no limiar térmico foi similar ao observado em ratos com dor neuropática por constrição crônica no nervo isquiático (22,24,32). Essa similaridade reforça a presença de dor neuropática nos ratos do presente estudo. Porém, diferentemente do que ocorreu nos ratos N4S0, as alterações na sensibilidade térmica não foram estatisticamente significativas nos grupos N1S3 e N2S2. À primeira vista, esse resultado sugere ausência de relação entre limiar de sensibilidade térmica e número de amarraduras em torno do nervo isquiático. Contudo, ao se analisar os percentuais de alterações nos grupos N1S3, N2S2 e N4S0 se observou maior queda no limiar térmico nos ratos N4S0, seguido dos ratos N2S2 e, por último, dos ratos N1S3. Esse resultado indica a possibilidade de relação entre limiar térmico e número de amarraduras em torno do nervo isquiático, tal como se observou no limiar mecânico. É possível que a falta de significância nos valores obtidos nos grupos N1S3 e N2S2 se deve a limitações no teste da placa quente usado no presente estudo. Segundo GUEDES et al. (33), um exemplo de limitação nesse teste é a impossibilidade de se estabelecer qual lado do corpo está dando menor sustentação ao peso do rato. No presente estudo, os ratos com lesão no nervo isquiático provavelmente tinham menor sustentação de seu peso corporal no lado lesionado. Porém, essa variável não pode ser medida no teste da placa quente usado no presente estudo. Apesar da limitação, o teste da placa quente é amplamente usado nos estudos de nocicepção em ratos (22-25). O percentual diferente na latência de resposta encontrado no presente estudo pode ser considerado um indicador de relação entre as respostas ao teste da placa quente e o número de amarraduras em torno do nervo isquiático.

O SFI foi também significativamente reduzido nos ratos com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático. Pela primeira vez se demonstrou que a diminuição foi maior nos ratos N4S0, seguido dos ratos N2S2 e N1S3. O SFI é um método confiável,

repetível e quantitativo para avaliar a função motora após lesão no nervo isquiático (34). É sugerido que a constrição crônica no nervo isquiático provoca alterações no padrão de caminhada de ratos devido à dor espontânea ocasionada pela lesão nervosa (35). Assim, pode-se sugerir que os valores do SFI nos ratos com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático se devam a nocicepção nesses ratos. Um apoio a essa sugestão é o resultado do SFI nos ratos do grupo N4S0, que foi similar ao descrito no modelo de constrição crônica no nervo isquiático (23,28,34). Os diferentes índices obtidos nos ratos dos grupos N4S0, N2S2 e N1S3 também apoiam a relação entre dor e SFI, uma vez que as diferenças podem ter ocorrido devido à distinta condição dolorosa medida no teste de von Frey.

Interessantemente, não houve variações estatisticamente significativas entre os grupos N4S0, N2S2 e N1S3. Esse resultado sugere inexistência de relação entre SFI e o número de amarrações em torno do nervo isquiático. Entretanto, é necessário cautela nessa interpretação, visto que os valores do SFI foram diferentes nos grupos, com o N4S0 apresentando o valor mais baixo, o N2S2 com valor 10 unidades superior ao N4S0, e o N1S3 10 unidades superior ao N2S2 e 20 unidades acima do N4S0. Sabe-se que em ratos com constrição por ligadura única no nervo isquiático, o grau de constrição nesse nervo determinou alterações gradativas na imunorreatividade à galanina, um neuropeptídeo com papel importante na dor, em neurônios do gânglio da raiz dorsal e da medula espinal (36). Nesse estudo, uma constrição leve (10-30% do diâmetro do nervo) provocou pequeno aumento na imunorreatividade em fibras amielínicas, o que ocasionou pequeno acréscimo no número de neurônios de pequeno diâmetro imunorreativos. Porém, a constrição média e forte (40-80% e 90%, respectivamente) afetou todos os tipos de axônios aferentes e induziu um aumento no número de neurônios imunorreativos, tanto de diâmetro pequeno como médio e grande, e um acréscimo acentuado na imunorreatividade no corno dorsal da medula espinal. É possível que nos ratos do presente estudo tenha ocorrido constrição média e forte, pois a amarração se deu em torno do tronco

comum do nervo isquiático. Assim, pode-se sugerir aumento de atividade em neurônios de diâmetro pequeno, médio e grande nos gânglios das raízes dorsais do nervo isquiático e em neurônios da medula espinal. Essa possível ativação pode ter contribuído para a similaridade nos valores do SFI nos ratos dos grupos N1S3, N2S2 e N4S0. Desta forma, é possível que haja relação entre o SFI e o número de amarrações em torno do nervo isquiático, embora no presente estudo tenha sido possível especular essa relação considerando apenas os percentuais de alterações no SFI nos diferentes grupos com lesão nervosa periférica.

Paralelamente às mudanças nos limiares mecânico e térmico e SFI, a constrição gradual no nervo isquiático aumentou gradualmente a SAG na medula espinal lombossacral. Como os valores de SAG na medula espinal de ratos N4S0 foram similares aos descritos em ratos com dor neuropática por constrição crônica no nervo isquiático (28), essa similaridade reforça o resultado obtido no grupo N4S0.

Diversos autores sugerem que o $O_2^{\bullet-}$ se relaciona com dor de várias etiologias, incluindo a dor neuropática (7,8,10). Como a SAG foi maior na medula espinal de ratos N4S0, seguido dos ratos N2S2 e N1S3, a diferença entre esses grupos pode ser devido ao número de amarrações em torno do nervo. Um apoio a essa sugestão é a existência de correlação significativa entre a SAG e as respostas ao teste de von Frey aos 3 dias após a cirurgia. Segundo GRACE et al. (15), as respostas graduais ao teste de von Frey se relacionam com o número de amarrações no nervo. Portanto, como a SAG se relaciona com a dor, e a alteração gradual na SAG parece ser decorrente da nocicepção medida nos ratos N1S3, N2S2 e N4S0, pode-se sugerir relação entre a SAG e o número de amarrações em torno do nervo isquiático em ratos com dor neuropática graduada.

No presente estudo também foi mostrado que a constrição gradual no nervo isquiático reduziu gradualmente os valores de tióis totais na medula espinal lombossacral. A diminuição no grupo N4S0 foi similar àquela descrita em ratos com constrição crônica no nervo

isquiático (12,13). Assim, nosso estudo reproduziu os dados da literatura nos ratos do grupo N4S0. Como se postula que a diminuição nos tióis totais se relaciona com a formação de ROS e de espécies reativas de nitrogênio (12,13) é possível que a redução nos tióis totais se relacione, em parte, com o aumento gradual na SAG. Outro fator que pode estar contribuindo para a queda nos valores de tióis totais é a inibição do trocador cistina-glutamato. Este é um transportador de glutamato que promove o efluxo de glutamato concomitante ao influxo de cistina. A cistina desempenha papel fundamental na síntese e função da glutatona. Em condições de dor, o aumento na concentração extracelular de glutamato inibe o trocador cistina-glutamato (37). Essa inibição pode também estar contribuindo para a depleção de glutatona e consequente redução nos valores de tióis totais na medula espinal de ratos com constrição gradual no nervo isquiático, uma vez que o diferente número de amarraduras no nervo pode ter induzido variação no fluxo de glutamato na medula espinal. Essa sugestão parece plausível pelo glutamato desempenhar papel importante na dor neuropática (38) e o limiar mecânico ter variado gradualmente nos ratos com dor neuropática induzida pela amarração gradual em torno do nervo isquiático. A correlação significativa entre a redução de tióis totais e as respostas ao teste de von Frey sugere que a diminuição nos tióis totais também se relaciona com o número de amarraduras em torno do nervo isquiático, assim como se observou na SAG.

Apesar de ocorrerem alterações nos valores de tióis totais, não houve mudanças significativas nos valores da TAC na medula espinal dos ratos dos grupos N1S3, N2S2 e N4S0. É possível que a falta de alterações na TAC tenha relação com a barreira hematoencefálica do sistema nervoso central. Apesar de a barreira hematoencefálica ser mais permeável em situações de dor, essa barreira ainda é capaz de dificultar a passagem de moléculas pró-nociceptivas do plasma ao tecido nervoso (39). Isso garante a manutenção de um microambiente homeostático capaz de manter as funções sensoriais e motoras do tecido.

Assim, é possível que a barreira, juntamente com as alterações intratecduais que visam manter a homeostase, seja a provável causa da falta de variação significativa na TAC na medula espinal dos ratos com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático. A falta de alterações significativas na TAC paralelamente à queda nos tíóis totais pode se relacionar a aumentos na atividade de outros sistemas antioxidantes. A atividade da catalase aumentou na medula espinal de ratos com dor neuropática por constrição crônica no nervo isquiático (24). Assim, o complexo quadro de alterações em distintos parâmetros pode ser o responsável pela falta de mudanças significativas na TAC na medula espinal, embora tenha ocorrido queda nos valores de tíóis totais nesse tecido.

Cabe mencionar ainda que o pequeno acréscimo na SAG na medula espinal dos ratos dos grupos sham e NOS4 pode ser decorrente dos procedimentos envolvendo a manipulação de tecidos profundos, como músculos e tecido conjuntivo adjacente durante o isolamento do nervo isquiático. É sugerido que esses procedimentos podem induzir dor (40). Segundo esses autores, a manipulação sham deve induzir uma sensibilização muito menor na medula espinal, o que deve provocar alterações distintas em parâmetros de estresse oxidativo em medula espinal. Essa diferença provavelmente foi a responsável pelas alterações distintas nos grupos sham e NOS4 quando comparados aos grupos com amarraduras em torno do nervo isquiático.

Concluindo, o presente estudo mostrou que a indução de dor por constrição gradual no nervo isquiático provocou alterações graduais no limiar de sensibilidade mecânica, o que está de acordo com estudo prévio que criou o modelo de dor neuropática graduada (15). Assim, o presente estudo reproduziu os dados da literatura, o que reforça os demais resultados obtidos no presente estudo. Pela primeira vez se mostrou os efeitos da dor neuropática graduada sobre o limiar térmico e o SFI. Apesar de não ter ocorrido mudanças significativas nesses parâmetros ao se comparar grupos com lesão nervosa entre si, não se pode excluir a possibilidade de relação entre o número de amarrações em torno do nervo e as alterações no

limiar térmico e no SFI, uma vez que houve diferenças graduais nos percentuais de mudanças desses parâmetros nos grupos com lesão nervosa. Paralelamente às mudanças nos parâmetros nociceptivos, observou-se aumento na SAG e redução nos valores de tióis totais na medula espinal lombossacral, os quais se correlacionaram com a redução no limiar mecânico. Esses resultados ampliam o conhecimento do modelo novo de dor neuropática, e mostram que esse modelo modifica gradualmente parâmetros oxidativos na medula espinal, e que testes como o da placa quente e da marcação das patas parecem promissores para a avaliação das alterações graduais na nocicepção. Assim, os resultados em conjunto favorecem uma maior utilização do modelo de dor neuropática graduada em estudos futuros.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 16: 17002.
2. Zhao H., et al. The role of microglia in the pathobiology of neuropathic pain development: what do we know? *Br J Anaesth.* 2017; 118:504-516.
3. Das V. An introduction to pain pathways and pain “targets”. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015; 131:1-30.
4. Von Hehn C.A., Baron R., Woolf C.J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* 2012; 73: 638-52.
5. Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 2009; 139:267-84.
6. Geis C., Geuss E., Sommer C., Schmidt H.H., Kleinschnitz C. NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. *Exp Neurol* 2017; 288:94-103.
7. Grace P.M., Gaudet A.D., Staikopoulos V., Maier S.F., Hutchinson M.R., Salvemini D., et al. Nitroxidative Signaling Mechanisms in Pathological Pain. *Trends Neurosci* 2016; 39:862-879.
8. Kim H., et al. Reactive Oxygen Species Donors Increase the Responsiveness of Dorsal Horn Neurons and Induce Mechanical Hyperalgesia in Rats. *Neural Plast.* 2015; 2015: 293423.
9. Poljsak B., Šuput D., Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:956792
10. Salvemini, D. et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med.* 2001; 51:951-66.

11. Halliwell B., Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.
12. Bhat et al. Effect of ursolic acid in attenuating CCI-induced neuropathic pain in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2016; 30:517-528.
13. 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. *Eur J Pain*. 2006; 10:573-9.
14. Jaggi A.S., Jain V., Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001; 25:1-28.
15. Grace et al. A novel model of graded neuropathic pain: Utility to investigate mechanisms of population heterogeneity. *J Neurosci Methods*. 2010; 193:47-53.
16. Nicotra L., et al. Sex differences in mechanical allodynia: how can it be preclinically quantified and analyzed? *Front. Behav. Neurosci*. 2014; 8:40.
17. Tang Y. et al. Interaction between astrocytic colony stimulating factor and its receptor on microglia mediates central sensitization and behavioral hypersensitivity in chronic post ischemic pain model. *Brain Behav. Immun*. 2017; S0889-1591:30478-6.
18. Hossain M. Z., et al. Neuron-glia crosstalk and neuropathic pain: involvement in the modulation of motor activity in the orofacial region. *Int J. Mol. Sci*. 2017; 18.
19. Grace P. M. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol*. 2014; 217-31.
20. Valverde Y. Spinal glial activation and oxidative stress are alleviated by treatment with curcumin or coenzyme Q in sickle mice. *Haematologica*. 2016; 101:e44-7.
21. Ge Y., Wu F., Sun X., Xiang Z., Yang L., Huang S., et al. Intrathecal infusion of hydrogen-rich normal saline attenuates neuropathic pain via inhibition of activation of spinal astrocytes and microglia in rats. *PLoS One* 2014; 9:e97436.

22. 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. *Neurosci Lett.* 2014; 569:163-8.
23. 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 Res Bull.* 2016; 121:169-77.
24. Goecks C.S., Horst A., Moraes M.S., Scheid T., Kolberg C., Belló-Klein A., Partata W.A. Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction of the sciatic nerve. *Neurochem Res.* 2012; 37:1952-8.
25. Shahid et al. A bacosides containing *Bacopa monnieri* extract alleviates allodynia and hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17:293.
26. Prashanth K., Asparna A., Ganesh Y. V., Ruby P. K., Shyam S. S., Ranadeep G., et al. PARP inhibition attenuates neuroinflammation and oxidative stress in chronic constriction injury induced peripheral neuropathy. *Life Sci.* 2016; 150:50-60.
27. De Medinacelli L. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77:634-43.
28. Horst. A., De Souza J. A., Santos M.C.Q., Riffel A.P.K., Kolberg C., Partata W. A. Effects of N-acetylcysteine on spinal cord oxidative stress biomarkers in rats with neuropathic pain. *Braz J Med Biol Res.* 2017; 50:e6533.
29. Erel. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37:277-85.

30. Wang, Z. et al. A newly identified role of superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 309:869-78.
31. 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. *Neurosci Lett.* 2001; 302:141-5.
32. Saffarpour S., Nasirinezhad F. Functional interaction between N-methyl-D-aspartate receptor and ascorbic acid during neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2017; 28:601-608.
33. Guedes R. P. Bosco L.D., Teixeira C. M., Araújo A. S. R., Belló-Klein A., Ribeiro M.F.M., et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochem Res.* 2006; 31:603-9.
34. Kato N, Matsumoto M, Kogawa M, Atkins GJ, Findlay DM, Fujikawa T. Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury *in vivo*. *J Neuroinflammation* 2013; 10: 1.
35. 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 Sci.* 2009; 84:622-6.
36. Coronel M. F., Brumovsky P. R., HOKFELT T., VILLAR M. J. Differential galanin upregulation in dorsal root ganglia and spinal cord after graded single ligature nerve constriction of the rat sciatic nerve. *J Chem Neuroanat.* 2008; 35:94-100.
37. Robert S. M. Sontheimer H. Glutamate transporters in the biology of malignant gliomas. *Cell Mol Life Sci.* 2014 ;71:1839-54.
38. Zhuo M. et al. Neuronal and Microglial mechanisms of neuropathic pain. *Molecular Brain* 2011; 4:31

39. Sauer R. S., Kirchner J., Yang S., Hu L., Leinders M., Sommer C., et al. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte deficiency in peripheral neuropathy. *Ann N Y Acad Sci.* 2017; 1405:71-88.
40. 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. *Neurochem Res.* 2013; 38:935-42.

Legendas das Figuras

Figure 1. Medidas das sensibilidades mecânica (A) e térmica (B) em ratos sem e com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático. Controle: ratos sem qualquer manipulação cirúrgica; sham: ratos que tiveram apenas lesão tecidual para visualização do nervo isquiático direito; NOS4: ratos sem amarradura no nervo isquiático direito, mas com 4 segmentos de fios de sutura no espaço subcutâneo; N1S3: ratos com nervo isquiático direito com 1 amarradura e 3 segmentos de fios de sutura no espaço subcutâneo; N2S2: ratos com nervo isquiático direito com 2 amarraduras e 3 segmentos de fios de sutura no espaço subcutâneo; N4S0: ratos com nervo isquiático direito com 4 amarraduras e nenhum segmento de fio de sutura no espaço subcutâneo. Os dados são mostrados como média \pm SEM. * Indica diferença significativa quando comparado ao tempo 0 (pré-lesão) do mesmo grupo experimental e aos grupos controle, sham e NOS4 ($P < 0,05$, ANOVA de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Tukey).

Figure 2. Índice Funcional do Nervo Isquiático (A) e percentual de redução desse Índice (B) em ratos sem e com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático. Para descrição dos grupos experimentais, consulte a Figura 1. Em (A), o eixo Y mostra os resultados em unidades, onde zero (± 11) significa normalidade e -100 ausência total de funcionalidade do nervo isquiático. Os dados são mostrados como média \pm SEM. * Indica diferença significativa quando comparado ao tempo 0 (pré-lesão) do mesmo grupo experimental e aos grupos naive, sham e NOS4 ($P < 0,05$, ANOVA de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Tukey). Em (B), considerou-se como 100% o valor obtido no teste realizado antes da cirurgia para a constrição no nervo isquiático (pré-lesão) do mesmo grupo experimental.

Figure 3. Medida da capacidade antioxidante total (TAC) no segmento lombossacral da medula espinal em ratos sem e com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático nos períodos 3 e 10 dias após a lesão. Para descrição dos grupos experimentais, consulte a Figura 1. Os dados são mostrados como média \pm SEM. Não houve diferença significativa entre os resultados dos diferentes grupos experimentais (ANOVA de duas vias).

Figure 4. (A) Medida da geração de ânions superóxido (SAG no segmento lombossacral da medula espinal em ratos sem e com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático nos períodos 3 e 10 dias após a lesão. (B) Correlação entre as respostas ao teste de von Frey e a SAG aos 3 dias após a lesão nervosa periférica. Para descrição dos grupos experimentais, consulte a Figura 1. Os dados são mostrados como média \pm SEM. ^a Indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle; ^b indica diferença significativa quando comparado aos valores pré-lesão do grupo experimental do período; ^c indica diferença significativa quando comparado aos grupos sham e NOS4 ($P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Tukey). Em (B), $P < 0,001$ indica o nível de significância; r indica o coeficiente de correlação; R^2 indica a inclinação da reta.

Figure 5. (A) Medida da concentração de tióis totais no segmento lombossacral da medula espinal em ratos sem e com dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático nos períodos 3 e 10 dias após a lesão. (B) Correlação entre as respostas ao teste de von Frey e os valores de tióis totais aos 3 dias após a lesão nervosa periférica. Para descrição dos grupos experimentais, consulte a Figura 1. Os dados são mostrados como média \pm SEM. ^a indica diferença significativa em relação ao grupo Naive, sham e NOS4. ^b indica diferença significativa em relação ao grupo N1S3 ($P < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste

de Tukey). Em (B), $P < 0,001$ indica o nível de significância; r indica o coeficiente de correlação; R^2 indica a inclinação da reta.

Figura 1

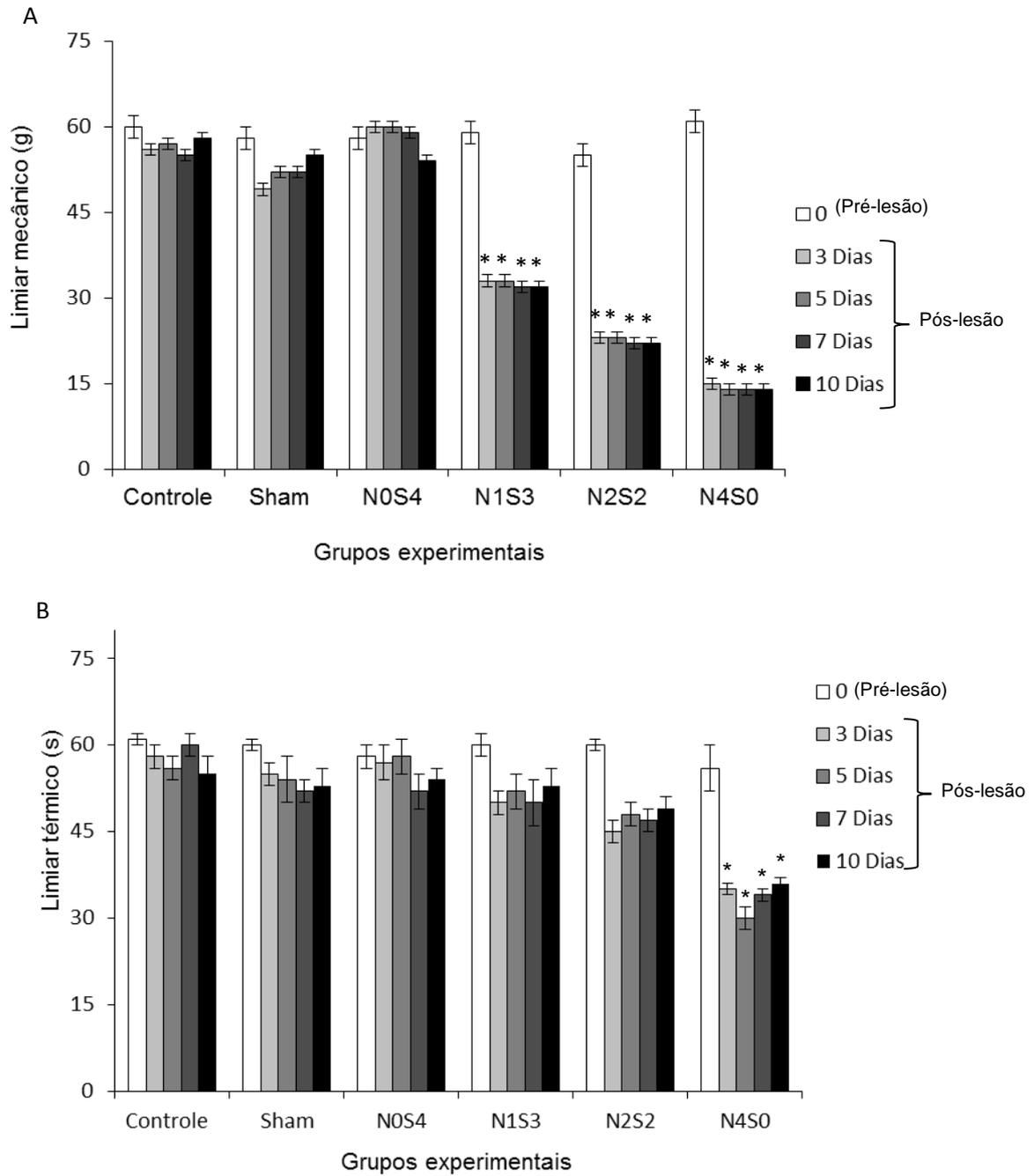


Figura 2

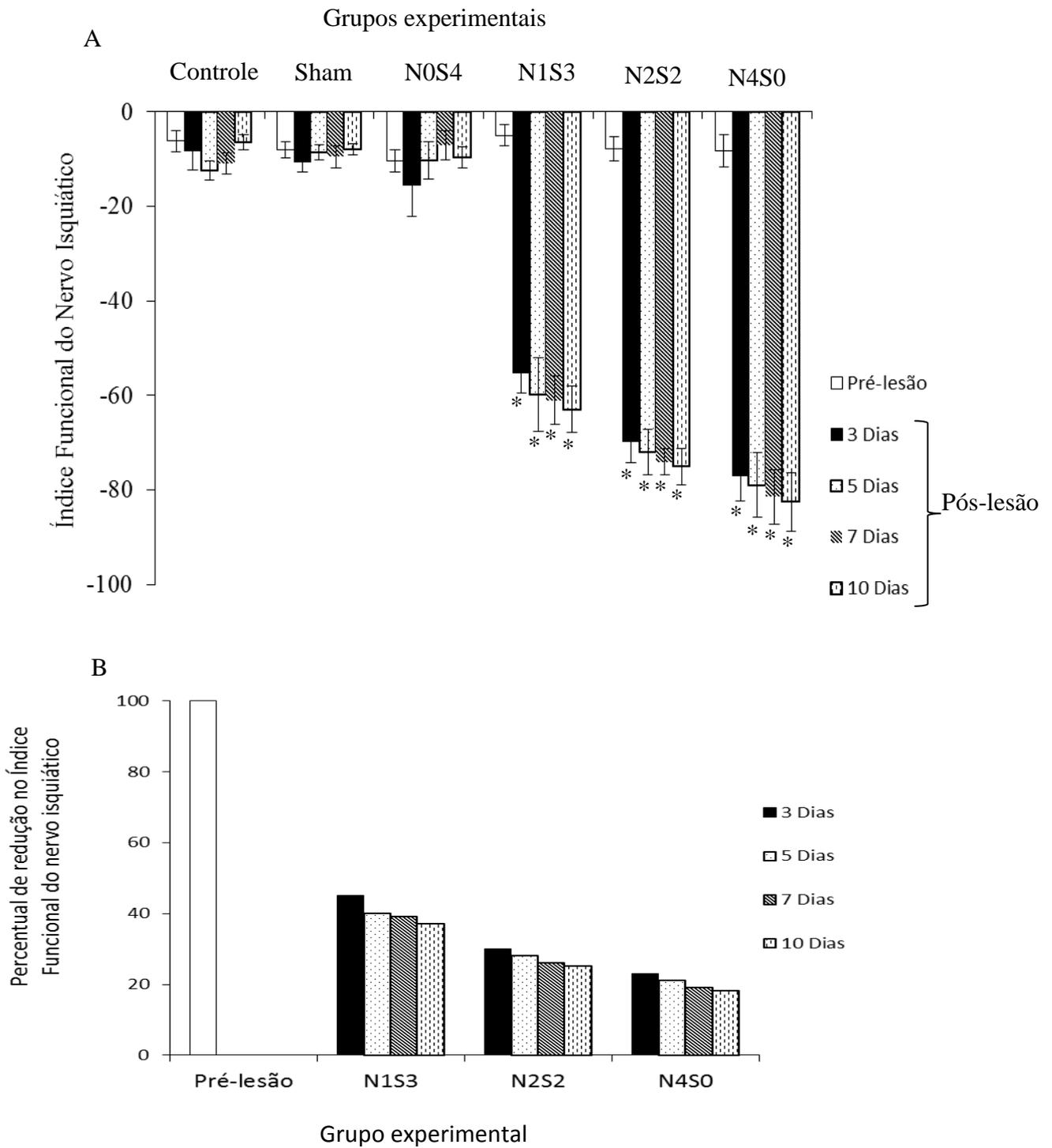


Figura 3

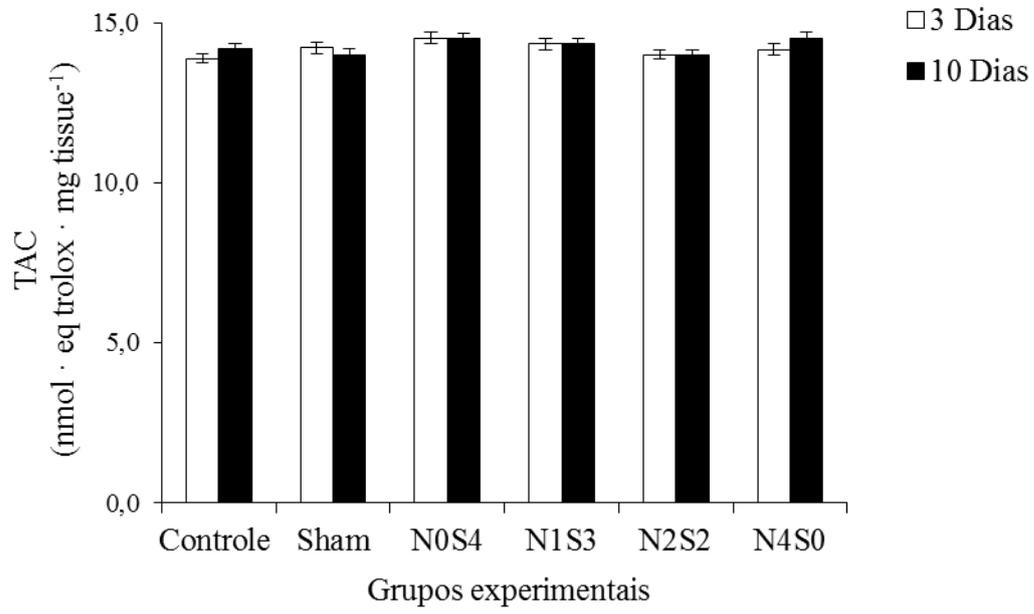


Figura 4

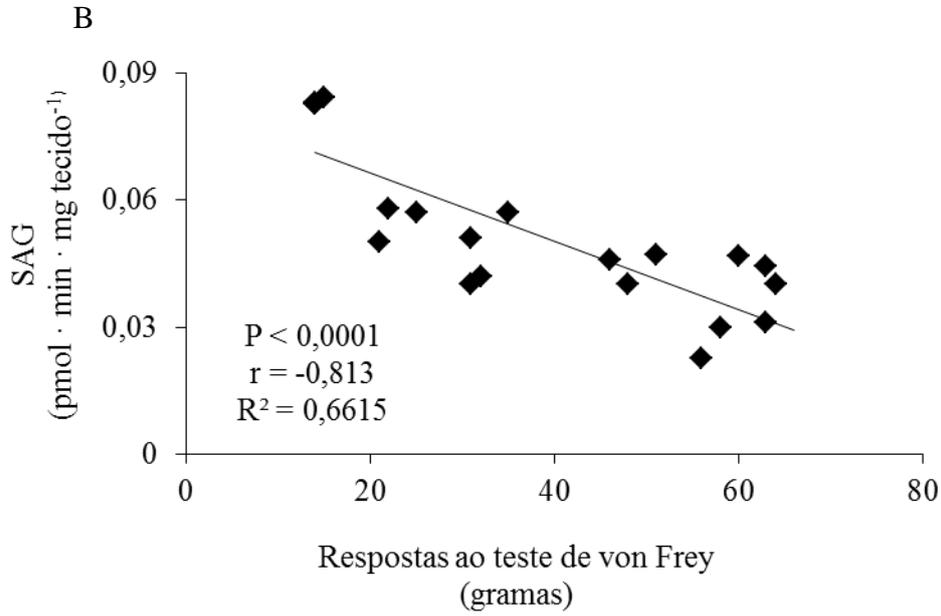
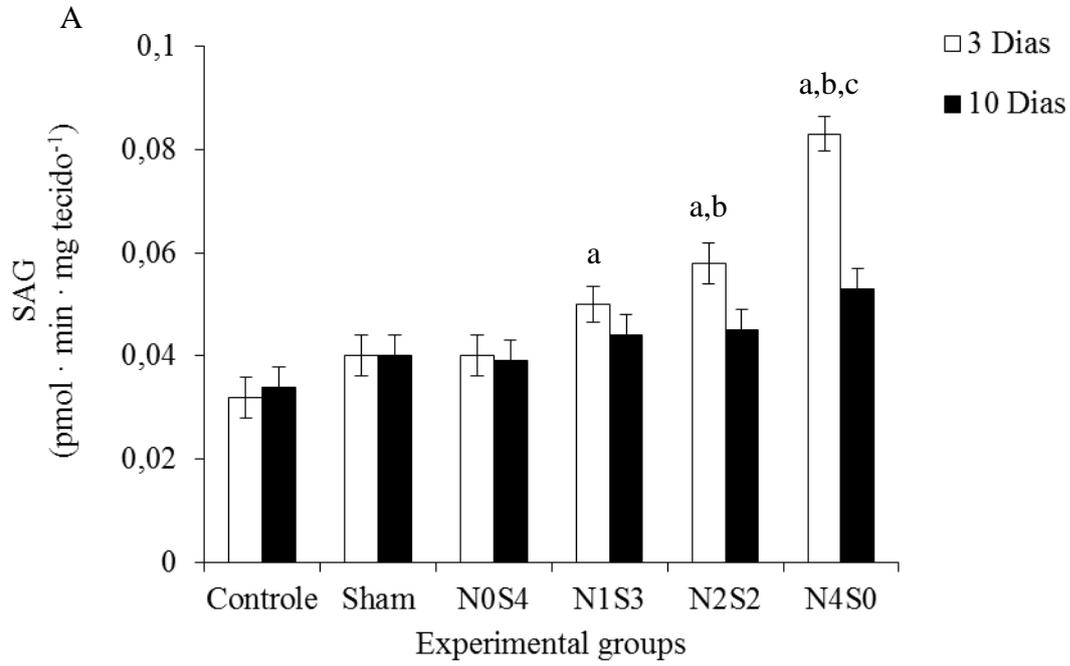
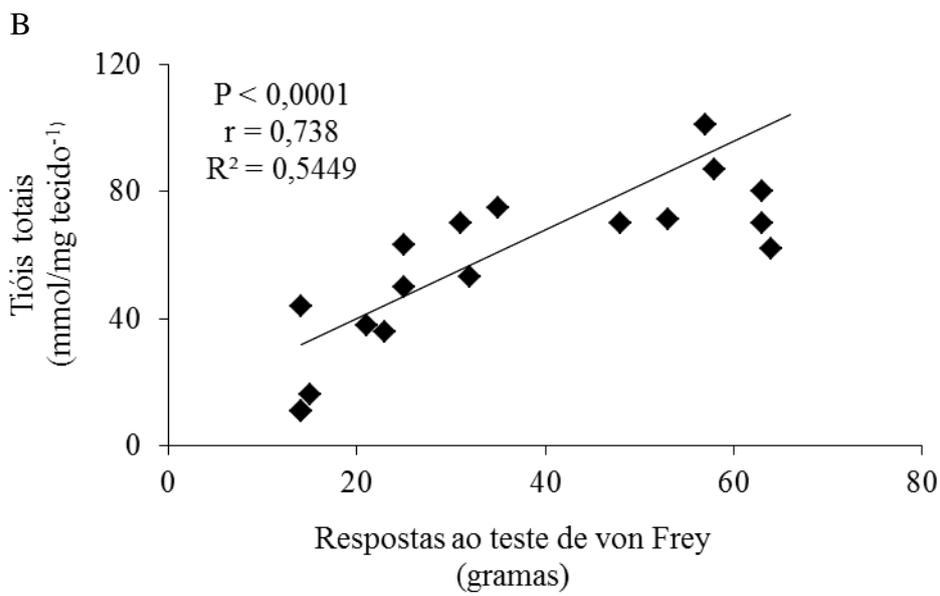
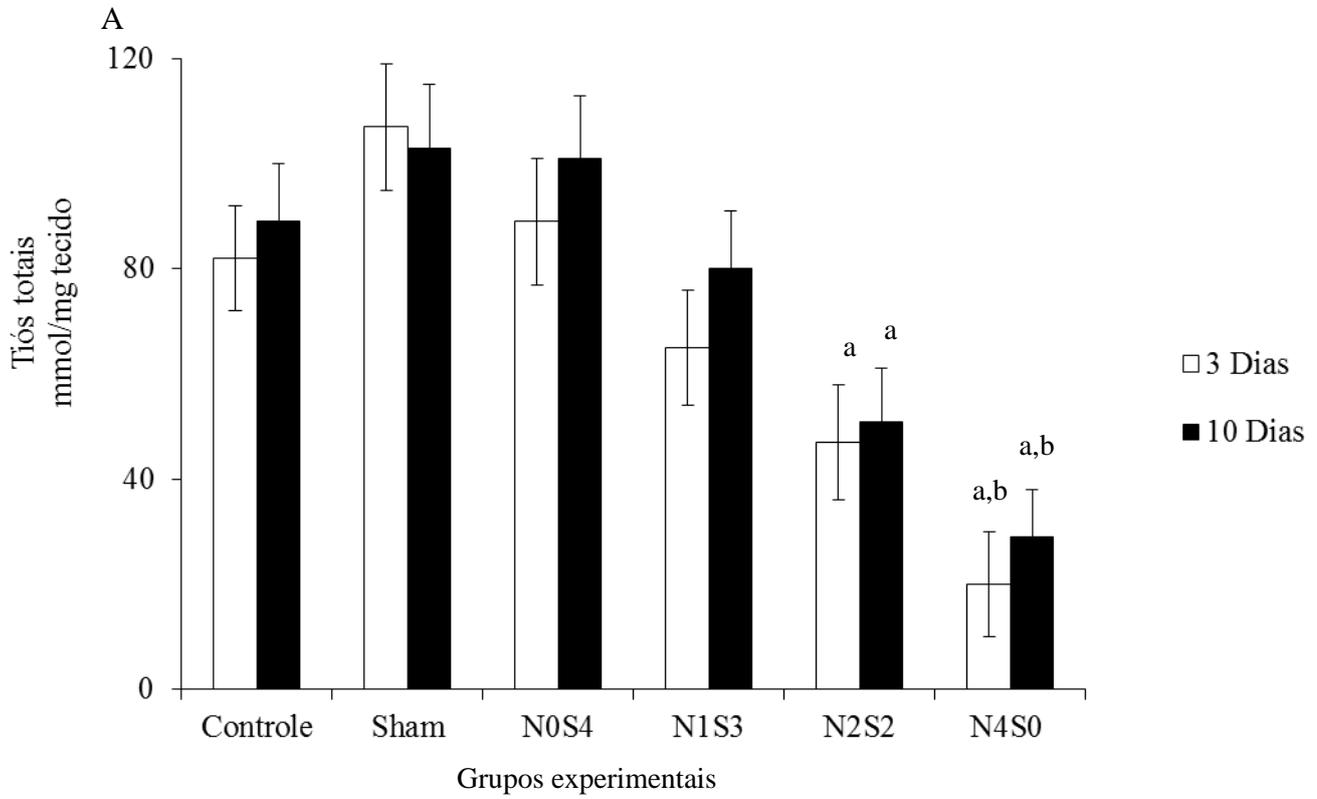


Figura 5



3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo reproduziu o modelo de dor neuropática induzida por constrição gradual em torno do nervo isquiático de ratos, uma vez que as respostas dos animais ao teste de von Frey, que avalia a sensibilidade mecânica, foi similar à descrita por GRACE et al. (2010), os pesquisadores que criaram o modelo. Pela primeira vez se mostrou que o limiar de sensibilidade térmica e o SFI também parecem variar de acordo com o número de amarraduras em torno do nervo isquiático, assim como a SAG e os valores de tióis totais na medula espinal lombossacral sem, contudo, induzir alterações significativas na TAC nesse tecido. Apesar de preliminares, esses resultados ampliam o conhecimento do modelo novo de dor neuropática e, assim, favorecem a maior utilização do modelo em estudos futuros.

Todavia, para melhor compreensão da relação da dor neuropática por constrição gradual no nervo isquiático de ratos e alterações graduais em parâmetros oxidativos na medula espinal torna-se necessária a realização de estudos complementares, tais como a medição dos níveis de óxido nítrico, dos hidroperóxidos lipídicos, do peróxido de hidrogênio, entre outros, já que estes possuem participação importante no mecanismo da dor.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. AMIN et al. The effect of verbascoside in neuropathic pain induced by chronic constriction injury in rats. **Phytotherapy Research**. v. 30(1). p. 128-135., 2016.
3. BALIKI M.N., APKARIAN A.V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**. v. 87. p. 474-491, 2015.
4. BARON R., BINDER A., WASNER G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**. v. 9. p. 807-819, 2010.
5. BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., SCHERRER, G., JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**. v. 139. p. 267-284, 2009.
6. BECKHAUSER; FRANCIS-OLIVEIRA; PASQUALE. Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological effects on synaptic plasticity. **Journal of Experimental Neuroscience**. v. 10. p. 23-48., 2016.
7. 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.
8. BEYERS, M. R.; BONICA, J. J. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: **Assessment of Pain**. p. 26-27, 2001.
9. CAREY E.T., AS-SANIE S. New developments in the pharmacotherapy of neuropathic chronic pelvic pain. **Future Science**. v. 5. p. 148, 2016.
10. CHOI Y. B., LIPTON S. A. Redox modulation of the NMDA receptor. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 57. p. 1535-1541., 2000.
11. 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.
12. COVARRUBIAS-PINTO A., ACUÑA A.I., BELTRÁN F.A., TORRES-DÍAZ L., CASTRO M.A. Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 27. p. 281-294, 2015.
13. DAS V. An introduction to pain pathways and pain "targets". **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. v.131. p. 1-30, 2015.

14. DROGE W. Free Radicals in the Pshysiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**. v. 82. n. 1. p. 47-95., 2002.
15. DUBNER, R. Pain research in animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 75. p. 128-132, 1983.
16. DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132, p. 237-251, 2007.
17. 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.
18. FARGHALY H. S. et al. Effect of dexmedetomidine and cold stress in a rat model of neuropathic pain: Role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . **European Journal Pharmacology**. v. 776. p. 139-145., 2016.
19. FEIN A. **NOCICEPTORS: The Cells That Sense Pain**. 2011.
20. 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.
21. FRIDOVICH I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**. v. 20. p. 1203-1209, 1998.
22. 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.
23. GOECKS C.S., HORST A., MORAES M.S., SCHEID T., KOLBERG C., BELLÓ-KLEIN A., PARTATA W.A. Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction of the sciatic nerve. **Neurochemistry Research**. v. 37. p. 1952-1958, 2012.
24. GRACE P. M. et al. A novel model of graded neuropathic pain: utility to investigate mechanisms of population heterogeneity. **Journal of Neuroscience Methods**. v.193:1. p.47-53., 2010.
25. GRACE P. M. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**. v. 14. p.217-231., 2014.
26. 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.

27. 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.
28. HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**. v. 70. p. 257-265, 2012.
29. HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**. v. 4. 2007
30. 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.
31. HOSSAIN M. Z., et al. Neuron-glia crosstalk and neuropathic pain: involvement in the modulation of motor activity in the orofacial region. **International Journal of Molecular Sciences**. v.18(10)., n. 2051., 2017.
32. HUANG et al. Concurrent bullatine A enhances morphine antinociception and inhibits morphine antinociceptive tolerance by indirect activation of spinal k-opioid receptors. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 196. p. 151-159., 2017.
33. 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.
34. JAGGI A.S., JAIN V., SINGH N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 25. p. 1-28, 2011.
35. KALLENBORN-GERHARDT et al. NOXious signaling in pain processing. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 137(3). p. 309-317., 2013.
36. KAVALIERS, M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. **Brain Research**.v. 21. p. 923-931, 1988.
37. 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.
38. KIM, H. K. et al. Reactive oxygen species play a important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, p. 116-124, 2004.
39. LOESER J.D. The future. Will pain be abolished or just pain specialists? **Minnesota Medicine**. v. 84. p. 1-20, 2001.

40. MACHELSKA H., CELIK M.Ö. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. **F1000Research**. v. 22. p. 27-43, 2016.
41. MEACHAM et al. Neuropathic pain: central vs. Peripheral mechanisms. **Current Pain and Headache Reports**. v. 6., 2017.
42. MELLER S.T., GEBHART G. F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**. v. 52(2). p. 127-136., 1993.
43. MILLAN, J. M. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. v. 57. p. 1-164, 1999.
44. MOSLEY R.L., BENNER E.J., KADIU I., THOMAS M., BOSKA M.D., HASAN K., LAURIE C., GENDELMAN H.E. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**. v. 6. p. 261-281, 2006.
45. 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.
46. NICKEL F.T., SEIFERT F., LANZ S., MAIHÖFNER C. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**. v. 22: p. 81-91, 2012.
47. Nicotra L., et al. Sex differences in mechanical allodynia: how can it be preclinically quantified and analyzed? **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v.8:40., 2014.
48. 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.
49. PIZZINO et al. Oxidative Stress: Harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017. n. 8416763., 2017.
50. POLJSAK B., ŠUPUT D., MILISAV 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.
51. 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.
52. SAFFARPOUR S., NASIRINEZHAD F. Functional interaction between N-methyl-D-aspartate receptor and ascorbic acid during neuropathic pain induced by chronic constriction

- injury of the sciatic nerve. **Journal Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**. v. 28(6). p. 601-608., 2017.
53. SALVEMINI, D. et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 951-966, 2011.
 54. SALVEMINI D., NEUMANN W. L. Peroxynitrite: a strategic linchpin of opioid analgesic tolerance. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 30. p. 194-202., 2009.
 55. 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.
 56. SHAHID et al. A bacosides containing *Bacopa monnieri* extract alleviates allodynia and hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 17:293., 2017.
 57. SIES H. et al. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. v. 4. p. 180-183., 2015.
 58. TANG Y. et al. Interaction between astrocytic colony stimulating factor and its receptor on microglia mediates central sensitization and behavioral hypersensitivity in chronic post ischemic pain model. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 159(17)30478-6., 2017.
 59. TOMPKINS 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.
 60. VALVERDE Y. Spinal glial activation and oxidative stress are alleviated by treatment with curcumin or coenzyme Q in sickle mice. **Haematologica**. v.101(2). p. 44-47., 2016.
 61. VANDERAH, T.W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North American**, v. 91.p. 1-12. 2007.
 62. VINCENT, K. *et al.* Spinal intracellular metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) contributes to pain and c-fos expression in a rat model of inflammatory pain. **Pain**. v. 158, n. 4, p. 705–16, 2017.
 63. VON HEHN C.A., BARON R., WOOLF C.J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**. v. 73. p. 638-652, 2012.
 64. ZHANG et al. Stimulation of spinal dorsal horn β 2-adrenergic receptor ameliorates neuropathic mechanical hypersensitivity through a reduction of phosphorylation of microglial p38 MAP kinase and astrocytic c-jun N-terminal kinase. **Neurochemistry International**. v. 101. p. 144-155., 2016.

65. 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.
66. ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 23-37, 2001.
67. WANG, Z. et al. A newly identified role of superoxide in inflammatory pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, p. 869-878, 2004.

APÊNDICE A – APROVAÇÃO ÉTICA



U F R G S
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: 27548

Título: AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO NERVO ISQUIÁTICO E DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM MEDULA ESPINAL DE RÁTOS COM DOR NEUROPÁTICA GRADUADA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

WANIA APARECIDA PARTATA - coordenador desde 05/01/2015

JÉSSICA ARAÚJO DE SOUZA - desde 05/01/2015

Ana Paula Konzen Riffel - Aluno de Doutorado desde 05/01/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 15/09/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 96 ratos linhagem Wistar machos adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 25 de Setembro de 2014

CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF MEDIACAL AND BIOLOGICAL RESEARCH

Brazilian Journal
of medical and biological research

ISSN 1414-431X *online*
version

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Publication charges](#)
- [Preparation of Research Manuscripts](#)
- [Manuscript categories](#)
- [Organization of the Manuscript](#)
- [How to submit a manuscript to the BJMBR](#)
- [Manuscript criteria and information](#)
- [Copyright](#)
- [Cell Biology](#)
- [Biological activity of natural products](#)
- [Editorial review and processing](#)
- [Related Links](#)

Since 1997 the Journal is published only as [Online Version](#)

2015 Impact Factor 1.146

Qualis 2014 - Medicine B2; Biological Sciences B4

Average time for submission until publication online on SciELO: 6 months

Scope and policy

The purpose of the *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* is to publish the results of original experimental research that contribute significantly to knowledge in medical and biological sciences. Major criteria for acceptance are scientific quality, originality, and conciseness. Preference will be given to manuscripts that develop new concepts or experimental approaches and are not merely repositories of data. Papers that report negative results require special justification for publication. Methodological papers shall be considered for publication provided they describe new principles or a significant improvement of an existing method.

The following papers will not be accepted for publication

- Studies on people not approved by an accredited Ethics Committee or without written informed consent from the subject or legal guardian.

- Studies on animals not approved by an accredited Ethics and Animal Care Committee.
- Manuscripts that report preliminary results or only confirm previously reported results.
- Manuscripts that describe the pharmacokinetics, bioavailability and toxicity of drugs in people or animals.
- Manuscripts that deal with transcultural adaptation and validation of instruments of measurements.
- Manuscripts that translate a text published in another language and validate it on local patients.
- Manuscripts that use questionnaires translated from the language of another country and their validation in local patients.
- Manuscripts that present only *in silico* analysis.
- Manuscripts from the area of veterinary medicine.
- The Journal does not publish toxicological studies.

Publication charges

- The authors are responsible for "publication charges" of all accepted papers. Publication charges will be billed to the Corresponding Author when the paper is accepted.
- The charge is R\$3.300,00/paper for Brazilian authors and US\$1.600,00/paper for authors outside Brazil and is independent of the length of the paper.

Preparation of Research Manuscripts

The *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* publishes original research articles of outstanding scientific significance. Manuscripts must be submitted in English. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a limited number of experiments. The key criteria are that the research clearly demonstrates its novelty, its importance to a particular field as well as its interest to those outside that discipline, and conclusions that are justified by the data.

Authorship requirements

Only those persons who contributed directly to the intellectual content of the paper should be listed as authors. Authors should meet all of the following criteria, thereby allowing persons

named as authors to take public responsibility for the content of the paper.

- Conceived, planned and carried out the experiments that led to the paper or interpreted the data it presents, or both.
 - Wrote the paper, or reviewed successive versions.
 - Approved the final version.
- Holding positions of administrative leadership, contributing patients, and collecting and assembling data, however important to the research, are not by themselves criteria for authorship. Other persons who have made substantial, direct contributions to the work but cannot be considered authors should be cited in the Acknowledgment section, with their permission, and a description of their specific contributions to the research should be given.

Cover Letter

It is important that you include a cover letter with your manuscript. Take the time to consider why this manuscript is suitable for publication in the *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Why will your paper inspire the other members of your field, and how will it drive research forward? Please explain this in your cover letter.

The cover letter should also contain the following information:

- Title of article.
- Name(s) of all author(s).
- Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, fax number and e-mail of author to whom correspondence should be sent.
- If a version of the manuscript has been previously submitted for publication to another journal, include comments from the peer reviewers and indicate how the authors have responded to these comments.
- Papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated) and that written informed consent was obtained from all participants. This information must also be cited in the Material and Methods section of the manuscript.

Text format

- The text of a manuscript can only be accepted as a Microsoft Word file created with MS Word as a ".doc", ".docx" or ".rtf" document.
- Each page should contain the page number in the upper right-hand corner starting with the title page as page 1.

- Report all measurements in Système International, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) and standard units where applicable (see below).
- Do not use abbreviations in the title and limit their use in the abstract and text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures must be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.
- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and country or electronic address of the manufacturer should be given in parentheses in the text.

Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources:

- Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers. 8th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006.
<http://www.scientificstyleandformat.org/Home.html>
- Medical Style and Format. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Writing scientific articles like a native English speaker: top ten tips for Portuguese speakers. Clinics (Sao Paulo). Mar 2014; 69(3): 153-157. doi: 10.6061/clinics/2014(03)01.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3935133/>

The *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (<http://www.icmje.org/>).

The writing style should be concise and accessible. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

Although we encourage submissions from around the globe, we require that manuscripts be submitted in American English. As a step towards overcoming language barriers, we encourage authors to seek the assistance of [professional services available on the homepage of the journal/Service and Information](#).

Footnotes

Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

Abbreviations

Abbreviations should be kept to a minimum. Define all abbreviations upon first use in the abstract and the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

- Explain all abbreviations in the abstract, text, figure and table legends **when they first appear**. Keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 mL, not 3 milliliters (mL)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Use abbreviations in figures and tables to save space, but they **must be defined in the legend**.

Nomenclature

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature. We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible: We strongly encourage the use of [SI units](#).

- s for second
- min for minute
- h for hour
- L for liter
- m for meter
- kDa for mass in kilodaltons
- 5 mM rather than 5×10^{-3} M or 0.005 M

Species names (e.g., *Homo sapiens*), genes, mutations, genotypes, and alleles should be italicized. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., HUGO for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text.

The [Recommended International Non-Proprietary Name \(rINN\)](#)

of drugs should be provided.

Manuscript categories

Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a Full-length Paper, Short Communication, Review Article, Overview, Concepts and Comments, or Case Report.

Full-length paper

Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis; the experimental design and methods used (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study; and a discussion placing the results in the context of published literature.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions
- no more than 40 references (without exceptions)

Short communication

A short communication is **a report on a single subject**, which should be concise but definitive. The scope of this section is intended to be wide and to encompass methodology and experimental data on subjects of interest to the readers of the Journal.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions

- no more than 20 references (without exceptions)
- no more than three illustrations (figures and/or tables)

Review article

A review article should provide a synthetic and critical analysis of a relevant area and should not be merely a chronological description of the literature. A review article by investigators who have made substantial contributions to a specific area in medical and biological sciences will be published by invitation of the Editors. However, an outline of a review article may be submitted to the Editors without prior consultation. If it is judged appropriate for the Journal, the author(s) will be invited to prepare the article for peer review. A minireview is focused on a restricted part of a subject normally covered in a review article.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text should be divided into sections with appropriate titles and subtitles
- no more than 90 references (without exceptions)

Overview

An overview does not contain unpublished data. It presents the point of view of the author(s) in a less rigorous form than in a regular review or minireview and is of interest to the general reader.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles
- no more than 90 references (without exceptions)

Concepts and Comments

The Concepts and Comments section provides a platform for readers to present ideas, theories and views.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles
- no more than 40 references (without exceptions)

Case report

A case report should have at least one of the following characteristics to be published in the Journal:

- special interest to the clinical research community
- a rare case that is particularly useful to demonstrate a mechanism or a difficulty in diagnosis
- new diagnostic method
- new or modified treatment
- a text that demonstrates relevant findings and is well documented and without ambiguity

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles
- no more than 20 references (without exceptions)
- no more than three illustrations (figures and/or tables)

Organization of the Manuscript

Most articles published in the *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* will be organized into the following sections:

Title, Authors, Affiliations, Abstract, Key words, Running Title, Author for Correspondence and email address

Introduction

Material and Methods

Results

Discussion

Acknowledgments

References

Tables with a short descriptive title and footnote legends

Figures with a short descriptive title, descriptive legends and

uniformity in format

Continuous page numbers are required for all pages including figures. There are no specific length restrictions for the overall manuscript or individual sections. However, we urge authors to present and discuss their findings concisely. We recognize that some articles will not be best presented in our research article format. If you have a manuscript that would benefit from a different format, please contact the editors to discuss this further.

Title Page

Title - The title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.

Example: **Single-step purification of crotapotin and crotactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing**

Authors and Affiliations

Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions). Institution(s) (Department, Faculty, University, City, State, Country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil).

Example:

A.S. Aguiar¹, A.R. Melgarejo¹, C.R. Alves² and S. Giovanni-De-Simone^{2,3}

¹Divisão de Animais Peçonhentos, Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ, Brasil

²Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

Abstract

Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data, to be appreciated by the reader. The *Brazilian Journal* publishes **unstructured abstracts** in a single paragraph. The abstract should not exceed 250 words.

The abstract should briefly and clearly present the objective, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions. It should mention the techniques used without going into methodological detail and mention the most important results.

Abbreviations should be kept to a minimum and should be defined in both the Abstract and text.

Please do not include any reference citations in the abstract. If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be

given within the abstract.

Please see

<http://www.bjournal.com.br/writing_a_good_abstract.html> for suggestions on writing a good abstract

Key Words

A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. A capital letter should be used for the first letter of each key word, separated by a semicolon. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see [http://www.scielo.br/bjmb;articles search/subject](http://www.scielo.br/bjmb;articles%20search/subject)) to index published articles.

Running title

This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.

Corresponding author

One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list is accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed in the Acknowledgments section. Provide the name and email address of the author to whom correspondence should be sent.

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. This should state the purpose of the investigation and justification for undertaking the research and relationship to other work in the field. An extensive listing or review of the literature should not be used. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about what was achieved.

Material and Methods

Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated.

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. We

encourage authors to submit, as separate files, detailed protocols for newer or less well-established methods. These will be linked to the article and will be fully accessible.

Results

The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. The Results section should provide results of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but a description of experiments that are peripheral to the main message of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supplementary files; these are published online linked to the article. The Results section should be written in past tense. In some situations, it may be desirable to combine Results and Discussion into a single section.

Discussion

The purpose of the Discussion is to identify new and relevant results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text, especially in Results, may be cited but all of the results should not be repeated in detail in the Discussion. The Discussion should spell out the major conclusions and interpretations of the work including some explanation of the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The Discussion should be concise and tightly argued. If warranted, the Results and Discussion may be combined into one section.

Acknowledgments

When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues. People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments section, along with their contributions. Donations of animals, cells, or reagents should also be acknowledged. You must also ensure that anyone named in the Acknowledgments agrees to being so named. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged in this section (agency and grant number).

Figures

Figures must be submitted in high-resolution version (600 dpi).

Please ensure that the files conform to our Guidelines for Figure Preparation when preparing your figures for production and/or

"Image Quality Specifications". The link contains important information about image quality from PubMed Central where the Brazilian Journal of Medical and Biological Research is indexed.

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research requires the same quality as PubMed Central. Please follow these instructions when you submit figures to the Brazilian Journal.

Preparing figure files for submission

The *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* encourages authors to use figures where this will increase the clarity of an article. The use of color figures in articles is free of charge. The following guidelines must be observed when preparing figures. Failure to do so is likely to delay acceptance and publication of the article.

- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file.
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figure titles and legends should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text.
- An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without moving back and forth between this window and the relevant parts of the text.
- Each legend should have a concise title of no more than 15 words. The legend itself should be succinct, while still explaining all symbols and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods. Statistical information should be given as well as the statistical tests used.
- Arrows or letters should be used in the figure and explained in the legend to identify important structures.
- Figures with multiple panels should use capital letters A, B, C, etc. to identify the panels.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements, when the accepted manuscript is prepared for publication.
- Individual figure files should not exceed 5 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere. In order

for all figures to be open-access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non-open-access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Supported file type

The following file format can be accepted: TIFF (suitable for images)  with 600 dpi.

Micrographs should be treated like photographs with the following additional guidelines

- [Electron micrographs](#) must contain a magnification bar with its equivalence in micrometers. This information can be found on all micrographs together with the magnification size.
- Details of any stains used and the method of preparation the sample should be given in the figure legend or in the Material and Methods section.
- Detailed information about the microscope used should be included in the Material and Methods section.
- The type of camera, photographic software and details of any subsequent image manipulation should be included in the Material and Methods section.

Tables

- Tables must be submitted in Word (.doc) or Excel (.xls), not as an image.
- Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text.
- Tables must have a concise and descriptive title.
- All explanatory information should be given in a footnote below the table. Footnotes should be used to explain abbreviations and provide statistical information, including statistical tests used.
- All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text.
- Tables must be understandable without referring to the text.
- Tables occupying more than one printed page should be avoided, if

possible.

- Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.
- Tables in Excel must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables.

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Meeting abstracts, conference talks, or papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only. All personal communications should be supported by a letter from the relevant authors. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references which are easily available in English should be cited.

The BJMBR uses the numbered citation (citation-sequence) method. References are listed and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in parentheses. Multiple citations within a single set of parentheses should be separated by commas without a space (1,5,7) . Where there are 3 or more sequential citations, they should be given as a range (4-9).

Because all references will be linked electronically (doi), if possible, to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For all references, **list the first 6 authors** followed by et al., Title of article, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages, The *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details. If the author uses the program "Reference Manager", copy the file containing the [style of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research](#) and place it in the folder of "Styles". When submitting the manuscript, send the file produced in Reference Manager (".rmd" and ".rmx") as an attachment.

Please use the following style for the reference list:

Published Papers. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation in italics), Year, Volume, Complete Pages. Lammers AE, Hislop AA, Flynn Y, Haworth SG. The 6-minute walk test: normal values for children of 4-11 years of age. *Arch Dis Child* 2008; 93: 464-468. Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Belin de CE, et al. Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1627-1633.

Article accepted for publication but not yet published. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation. Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

Internet Communication. Ensure that URLs are active and available. Provide DOI, if available.

Developmental toxicology.

<http://www.devtox.org/nomenclature/organ.php>. Accessed April 10, 2015.

CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>.

Accessed March 16, 2006.

CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I".

<http://fomentonacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>.

Accessed March 16, 2006.

Audiovisual Material

Physician's Desk Reference (PDR). Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

Computer Program

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. *Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.

Patent

Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

Book, Whole. Authors, Book title, Edition, City, Publisher, Year.

American College of Sports Medicine. *Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

Book, Chapter. Authors, Chapter Title, Editors, Book title, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

Kronfol A. Behavioral effects of cytokines: a psychiatrist's perspective. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA (Editors), *Cytokines, stress and immunity*. London: CRC Press; 2007. p 1-16.

Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), *Plants that fight cancer*. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.

Report

WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). *Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.
National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake up America: a national sleep alert*. Washington: Government Printing Office; 1993.

National Heart Lung and Blood Institute. Global Initiative for Asthma (GINA). *Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO Workshop Report*. Bethesda: National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute publication No. 02-3659; 2006.

Thesis

Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypriformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

Conference, Symposium Proceedings. Cite papers only from published proceedings.

Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. *Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology*. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

"Unpublished results", "Personal communication" and "Submitted papers". Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list. (Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results). It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication" is cited.

How to submit a manuscript to the BJMBR

Author Instructions

Please make sure you have read through these instructions carefully before beginning the submission process.

Please go to www.bjournal.com.br at the right-hand corner of the home page and click on SUBMIT A MANUSCRIPT and follow the directions. If you need further assistance, please contact the Journal Staff directly (bjournal@terra.com.br). Manuscript preparation instructions can be found at <http://www.bjournal.com.br>.

Submission Process

The seven steps of the submission process are: Type, Title & Abstract; Attributes; Authors & Institutions; Recommended Reviewers; Details & Comments; File upload; Review & Submit.

The steps each contain sub-steps that can be accessed by clicking on their respective tabs.

Manuscript criteria and information

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is a peer-reviewed electronic journal published monthly by the Associação Brasileira de Divulgação Científica (ABDC).

Submission of a manuscript to the Brazilian Journal implies that the data have not been published previously and will not be submitted for publication elsewhere while the manuscript is under review.

The following represent "prior publication": any printed material in excess of 500 words describing results or methods of a submitted/in press manuscript; published tables or illustrations that duplicate the content of a manuscript; electronic manuscripts or posters available via the Internet. When part of the material in a manuscript has been presented as a preliminary communication or in an unrefereed symposium, this should be cited as a footnote on the title page and a copy should accompany the submitted manuscript.

Copyright

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research (BJMBR) applies the [Creative Commons Attribution License](#)

(CCAL) to all works published (read the [human-readable summary](#) or the full license legal code). Under the CCAL, authors retain ownership of the copyright for their article and can allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles published in the BJMBR, as long as the original authors and source are cited. **No permission is required from the publishers.**

Cell Biology

The main characteristic of research papers in the area of Cell Biology is the emphasis on the integration at the cellular level of biochemical, molecular, genetic, physiological, and pathological information. This section considers manuscripts dealing with either prokaryotic or eukaryotic biological systems at any developmental stage. Papers on all aspects of cellular structure and function are considered to be within the scope of Cell Biology by the BJMBR. The Editors encourage submission of manuscripts defining cell biology as an area of convergence of several other research fields, especially manuscripts providing insights into the cellular basis of immunology, neurobiology, microbial pathology, developmental biology, and disease. Manuscripts containing purely descriptive observations will not be published. Manuscripts reporting new techniques will be published only when adequately validated and judged by the Editors to represent a significant advance.

Biological activity of natural products

The Journal will consider papers for publication which describe the activity of substances of biological origin only if they satisfy all of the following criteria:

- Papers should describe the separation of the crude material into fractions (not necessarily into homogeneous materials) with the fractions containing biological activity identified clearly in the separation scheme. Phytochemical studies should be accompanied by biological tests. A survey of pharmacological activity of plant extracts or teas will not be considered for publication.
- In addition to the demonstration of activity in one or more biological system, experiments must be performed attempting to provide information concerning the mechanism(s) of action of the substance(s) being tested.
- Sufficient experimental information must be provided to permit repetition of the preparation of fractions and the

- bioassay used.
- Sources should be identified completely, and, if plant material, a specimen should be classified by an expert and deposited in a local botanical garden, university or research institute. The name and institution of the person who classified the plant and the number of the voucher under which it was deposited should be provided in the Material and Methods section.
- **The Journal does not publish toxicological studies.**

Editorial review and processing

The receipt of manuscripts is acknowledged immediately. Once a paper has been evaluated by peer review, the authors will be notified of the editorial decision.

Papers accepted on scientific merit for publication sent to authors for scientific english correction and galley proofs will be sent to authors for the correction of errors. Authors are responsible for all statements made in their article, including changes made by the copy editor and authorized by the corresponding author.

The dates of receipt and acceptance will be published for each article. Authors are expected to return manuscripts to the Journal within 15 calendar days after they are sent to them for modifications or for style and copy editing, and to return galley proofs within 72 hours. The total number of "late" days will be added to the submission date at the time of publication.

Related Links

- Writing a Good Abstract (http://bjournal.com.br/writing_a_good_abstract.html)
- Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (<http://www.icmje.org/index.html>)
- The Système International (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) in metric units is used for units and abbreviations of units.
- Instructions to Make Quality Images for Publications - <http://cjs.cadmus.com/da/>
- The Editorial Policies of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research (<http://www.bjournal.com.br/policies.htm>)
- Writing Papers for Scientific Journals (http://www.bjournal.com.br/lectures_english.html)
- How Editors Evaluate Scientific Papers for Publication

(http://bjournal.com.br/2006_como_editores_avaliam_english_aug_10.zip)

- Effect of SciELO Open Access on Brazilian Scientific Journals
(http://bjournal.com.br/2006_OPEN_ACCESS_ENGLISH_LONG_aug_10.zip)
- Sense About Science
(<http://www.senseaboutscience.org.uk/index.php/site/project/30/>)
- *PLoS Biology* Guidelines for Table and Figure Preparation
(<http://www.plosbiology.org/static/figureGuidelines>)