



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Jhenifer Karvat

**Diacereína como alternativa terapêutica ao tratamento da dor neuropática,  
recuperação funcional e comorbidades emocionais associadas: evidências  
obtidas em modelo experimental de lesão nervosa periférica em camundongos**

Florianópolis

2021

Jhenifer Karvat

**Diacereína como alternativa terapêutica ao tratamento da dor neuropática, recuperação funcional e comorbidades emocionais associadas: evidências obtidas em modelo experimental de lesão nervosa periférica em camundongos**

Tese submetida ao Programa de pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos

Coorientação: Profa. Dra. Morgana Duarte da Silva

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Karvat, Jhenifer

Diacereína como alternativa terapêutica ao tratamento da dor neuropática, recuperação funcional e comorbidades emocionais associadas: evidências obtidas em modelo experimental de lesão nervosa periférica em camundongos / Jhenifer Karvat ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos, coorientadora, Morgana Duarte da Silva, 2021.  
102 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Lesão Nervosa Periférica. 3. Regeneração Nervosa. 4. Hiperalgesia. 5. Diacereína. I. Santos, Adair Roberto Soares dos. II. Silva, Morgana Duarte da . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

Jhenifer Karvat

**Diacereína como alternativa terapêutica ao tratamento da dor neuropática, recuperação funcional e comorbidades emocionais associadas: evidências obtidas em modelo experimental de lesão nervosa periférica em camundongos**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.  
Instituição UFSC

Prof. Elisa Cristiana Winkelmann Duarte, Dra.  
Instituição: UFSC

Prof. Vinicius M. Gadotti, Dr.  
Instituição: The University of Calgary-UofC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Neurociências.

---

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos  
Orientador

Florianópolis, 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, Angela M. A. Karvat e Valter Karvat, pelo incentivo, amor, educação e dedicação que sempre tiveram pelos filhos.

E ao meu noivo Rodolfo, pelo seu companheirismo, carinho, respeito e por sempre estar ao meu lado.

Amo vocês!!!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades que têm me dado, por trilhar o meu caminho e me guiar aos meus objetivos.

Aos meus pais, Angela e Valter, e aos meus irmãos por estarem sempre ao meu lado em todas as dificuldades. Obrigada pelo apoio, mesmo que a distância. Obrigada por terem paciência comigo. Vocês são meu porto seguro, e contribuíram muito para que eu chegasse até aqui. Não tenho palavras para descrever o amor que sinto por vocês...

Ao meu noivo Rodolfo Lorbieski, a pessoa mais incrível que eu conheci. Sempre estive ao meu lado para dar todo suporte. Também teve que colocar a mão na “massa” hehehe... Em vários finais de semana e feriados que tiveram experimentos, ele me acompanhava até a UFSC e ajudava quando necessário hehehe... Obrigada pela paciência de sempre... Obrigada por estar ao meu lado em toda a trajetória... O caminho até chegar aqui não foi fácil, mas seu apoio e sua ajuda foram fundamentais.

Ao meu orientador Professor Dr. Adair R. S. Santos, pela oportunidade de fazer o doutorado em seu laboratório (LANDI). Lembro que cheguei na UFSC sem conhecer o LANDI e o professor Dr. Adair abriu as portas para mim. Nesses anos de pesquisa aprendi muito e vou levar esse aprendizado para toda a vida. Com certeza teve vários obstáculos, dificuldades, desafios, mas só tenho a agradecer. Obrigada por todo ensinamento.

Sem palavras para agradecer a Prof<sup>a</sup> Dra. Morgana por todo o carinho e respeito que ela teve comigo, mesmo sendo no finalzinho da tese, corrigindo, sempre disposta a ajudar e dando palavras de apoio. Foi fundamental, estou imensamente grata!!!

Na Pesquisa é de suma importância a participação e auxílio de colegas e amigos de laboratório. Eles são excepcionais, fazer esse trabalho sem a participação deles seria bem mais difícil. Aqui gostaria de deixar minha gratidão e carinho que

tenho por todos os “landianos”, “landianas” e em geral aos amigos que fiz durante o doutorado, com os quais eu convivi e que me auxiliaram de alguma forma nesta jornada, como ajudando nos experimentos, tirando dúvidas que surgiam no meio do caminho, e até por meio de uma conversa amiga e descontraída feita na pausa do café: Tassiane, Larissa, Scheila, Kelly, Gustavo, Jhonatan, Jeane, Marcos, Carol, Karine, Cibelle, Marina, Simone, Tiago, Igor Kunze, Caroline C. E. Santo, Fernando Fiorin, Gleici.

Em especial vou agradecer a Tassiane uma grande amiga que morou junto comigo por um tempo. Fizemos diversos projetos. Lavamos muitas caixas de animais. É pouco espaço para descrever o quanto trabalhamos juntas. Fizemos de tudo um pouco e uma ajudava a outra e isso foi essencial para a concretização da tese. Nos tornamos amigas dentro e fora do laboratório, uma amizade para a vida toda. Obrigada por tudo!!!

Kelly e Scheila obrigada pela parceria em diversas palestras, e Scheila agradeço a ajuda em vários momentos, principalmente com ELISA...

Gustavo, Jhonatan e Jeane (ICs do LANDI), vocês sempre estavam dispostos a ajudar nos experimentos e em outros projetos, fico muito grata!!!

Marcos (engenheiro do lab), uma vez ou outra sempre procurávamos os seus serviços para construir ou arrumar algo kkkkk... Grata!!!

Nas pausas para o café também tenho que agradecer a Carol, entre um lanche e outro sempre tinha uma coxinha para ativar o sistema de recompensa kkkkk...

A todos os membros, alunos e professores, do programa de pós-graduação em Neurociências (PPGNeuro), pois as aulas, as discussões em sala, os congressos/simpósios acrescentaram muito no aprendizado.

Aos funcionários da UFSC, em especial ao Flávio, ao seu Carlos, a dona Vilma e ao Nivaldo, os quais tive o prazer de conhecer e que tenho um carinho imenso.

Ao Gilberto técnico do laboratório de histologia da UFSC, pelos conselhos e dicas que foram importantíssimas na construção deste trabalho. Agradeço também a

todo pessoal do LAMEB (UFSC), sempre atenciosos. A utilização deste laboratório auxiliou em boa parte da pesquisa.

Aos animais de laboratório, utilizados na pesquisa, toda minha gratidão e respeito.

À Capes, pelo suporte financeiro (bolsa de estudos).

Por fim, a todos os colaboradores do projeto que não foram citados, mas que direta e indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho. Todos foram imprescindíveis!!! Muito obrigada!!!

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo da guarda”.

(Joseph Addison)

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

(Robert Collier)

## RESUMO

As lesões nervosas periféricas geram um impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos. Ainda não existe um tratamento totalmente eficaz e que acelere a recuperação sensório-motora e promova melhora funcional e alívio da dor após uma lesão nervosa. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com diacereína (DIA) no modelo experimental de esmagamento do nervo isquiático em camundongos. A DIA é um fármaco com atividade analgésica e anti-inflamatória que já é utilizada na clínica para o tratamento da osteoartrite. Neste estudo foram utilizados camundongos Suíços machos, separados aleatoriamente em seis grupos (n= 8 por grupo): FO (Falso-operado + veículo); FO + DIA (Falso-operado + DIA 30 mg/kg); LNI (Lesão do nervo isquiático + veículo); LNI + DIA 3, 10 e 30 mg/kg (lesão do nervo isquiático + tratamento com DIA nas doses de 3-30 mg/kg). A DIA ou veículo foram administrados 24 horas após procedimento cirúrgico, por via intragástrica (gavagem), duas vezes por dia. A lesão do nervo isquiático direito foi gerada pelo esmagamento por 30 s com uma pinça hemostática. Na primeira etapa do estudo verificamos que a lesão do nervo provocou um quadro algíco intenso (hiperalgesia/alodinia) e déficits funcionais nos animais em comparação aos grupos falso-operados, sendo que o tratamento com diacereína, principalmente na dose de 30 mg/kg, acelerou a recuperação sensório-motora do animal e apresentou redução da hiperalgesia e melhora da função motora. Além disso, os animais do grupo LNI apresentaram um comportamento de desesperança, anedonia e falta de bem-estar que foi significativamente inibido pelo tratamento com DIA (30 mg/kg). Em outra etapa dos experimentos, foi verificado histologicamente que no 15º dia após a lesão os animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático apresentaram destruição tecidual, degeneração das fibras nervosas e presença de células inflamatórias, em contraste com os animais falso-operados, em que foram visualizadas fibras nervosas intactas e organização tecidual. Nos animais submetidos à lesão e tratados com DIA 30 mg/kg (LNI+DIA 30 mg/kg) observou-se ainda diminuição das áreas em degeneração e do processo inflamatório. Na morfometria, o grupo LNI apresentou redução significativa dos diâmetros das fibras nervosas, dos axônios e da bainha de mielina comparados aos grupos falso-operados, sendo que o grupo LNI+DIA 30 mg/kg apresentou recuperação significativa de todos os parâmetros analisados em relação ao grupo LNI. Em adição, foi observado no nervo isquiático direito 7 dias após a lesão o aumento significativo da concentração da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e redução do fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF) nos animais operados (grupo LNI), sendo que o tratamento dos animais com DIA evitou o aumento de IL-1 $\beta$  e a redução de BDNF. Conclui-se que a diacereína, administrada terapêuticamente pela via oral, promoveu redução da hiperalgesia e do comportamento de desesperança, anedonia e falta de bem-estar. Além disto, foi observado que a DIA também acelerou a regeneração nervosa periférica promovendo a recuperação funcional por um mecanismo de ação que depende, pelo menos em parte, da redução da concentração da IL-1 $\beta$  e aumento do BDNF. Esses dados analisados e conjunto, fornecem evidências científicas para o uso terapêutico incremental da DIA nas condições patológicas associada a lesões nervosas periféricas.

**Palavras-chave:** Traumatismos dos Nervos Periféricos. Regeneração nervosa. Hiperalgesia. Reposicionamento de Medicamentos.

## ABSTRACT

Peripheral nerve injuries have a negative impact on individuals' quality of life. There is still no fully effective treatment that accelerates sensorimotor recovery and promotes functional improvement and pain relief after a nerve injury. This study aimed to evaluate the effect of diacerein treatment (DIA) on the experimental model of sciatic nerve crush in mice. DIA is a drug with analgesic and anti-inflammatory activity that is already used in the clinic for treat osteoarthritis. In this study, male Swiss mice were used, randomly separated into six groups (n = 8 per group): FO (False-operated + vehicle); FO + DIA (False-operated + diacerein 30mg/kg); SNI (Sciatic nerve injury + vehicle); SNI + DIA in doses of 3, 10 and 30mg/Kg (sciatic nerve injury + treatment with diacerein in doses of 3-30 mg/kg). DIA or vehicle was administered 24 hours after the surgical procedure, intragastrically (gavage), twice a day. The lesion of the right sciatic nerve was generated by crush for 30 s with a hemostat. In the first stage of the study, we found that the nerve injury caused intense pain (hyperalgesia/allodynia) and functional deficits in animals compared to the false-operated groups. Moreover, the treatment with diacerein, mainly at the dose of 30mg/kg, it accelerated the animal's sensorimotor recovery and showed a reduction in hyperalgesia and improved motor function. Also, the SNI group's animals showed a behavior of hopelessness, anhedonia, and lack of well-being that was significantly inhibited by treatment with DIA (30 mg/kg). In another stage of the experiments, it was histologically verified that on the 15th day after the injury, the animals submitted to sciatic nerve crush presented tissue destruction, degeneration of nerve fibers and the presence of inflammatory cells, in contrast to the false-operated animals, in which intact nerve fibers and tissue organization were seen. In animals submitted to the lesion and treated with DIA 30mg/kg (SNI + DIA 30mg/kg), there was also a decrease in the areas in degeneration and in the inflammatory process. In morphometry, the SNI group showed a significant reduction in the diameters of nerve fibers, axons and myelin sheath compared to the false-operated groups. The SNI + DIA 30mg/kg group showed significant recovery of all parameters analyzed to the SNI group. Besides, a considerable increase in the concentration of interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) and a reduction in the brain-derived growth factor (BDNF) in the operated animals (SNI group) was observed in the right sciatic nerve 7 days after the injury. The treatment of animals with DIA prevented an increase in IL-1 $\beta$  and a reduction in BDNF. It is concluded that diacerein, administered therapeutically orally, reduced hyperalgesia and the behavior of hopelessness, anhedonia, and lack of well-being. In addition, it was observed that DIA also accelerated peripheral nerve regeneration, promoting functional recovery by a mechanism of action that depends, at least in part, on reducing the concentration of IL-1 $\beta$  and increasing BDNF. These data analyzed and taken together provide scientific evidence for the incremental therapeutic use of DIA in pathological conditions associated with peripheral nerve injuries.

**Keywords:** Peripheral Nerve Injuries. Nerve Regeneration. Hyperalgesia. Drug Repositioning.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação da LNP de acordo com Seddon (1943).....	23
Figura 2 – Classificação da LNP de acordo com Sunderland (1951).....	24
Figura 3 – Eventos celulares após lesão do nervo periférico – Degeneração Walleriana.....	29
Figura 4 – Eventos inflamatórios ativados após LNP.....	30
Figura 5 – Esmagamento do nervo isquiático direito.....	49
Figura 6 – Linha do tempo dos testes comportamentais.....	52
Figura 7 – Avaliação da hiperalgesia mecânica com o filamento de von Frey (0,4 g).....	54
Figura 8 – Comportamento de guarda da pata.....	55
Figura 9 – Hiperalgesia térmica (teste da acetona).....	56
Figura 10 – Teste do Campo aberto.....	57
Figura 11 – Índice funcional do nervo isquiático.....	58
Figura 12 - Teste da escada horizontal.....	60
Figura 13 – Teste de suspensão pela cauda.....	61
Figura 14 - Teste do nado forçado.....	62
Figura 15 - Teste de preferência por sacarose.....	63
Figura 16 – Análise morfométrica do nervo isquiático.....	65
Figura 17 – Efeito da diacereína sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio observada nos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.....	68
Figura 18 – Efeito da diacereína na dor espontânea observada nos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.....	69
Figura 19 – Efeito da diacereína sobre atividade locomotora observada nos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.....	71
Figura 20 - Efeito da diacereína na recuperação funcional dos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.....	73
Figura 21 – Efeito da diacereína na disfunção emocional observada nos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.....	75
Figura 22 – Efeito da diacereína na regeneração nervosa periférica após lesão do nervo isquiático: análise morfométrica.....	77
Figura 23 - Morfologia do nervo isquiático.....	79

Figura 24 - Efeito da diacereína sobre a concentração de IL-1B e de BDNF no nervo isquiático de camundongos.....	81
Figura 25 – Diacereína como alternativa terapêutica na lesão nervosa periférica: evidências obtidas utilizando o modelo de esmagamento do nervo isquiático em camundongos.....	91

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Opções terapêuticas para regeneração do nervo periférico .....	39
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento das etapas com número de animais. O experimento ocorreu em três momentos diferentes: durante 28, 15 e 7 dias. ....	52
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-Inflamatório Não Esteroide
Akt	Proteína quinase B
ALCAR	Acetil L-carnitina
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
BDNF	Fator de Crescimento Derivado do Encéfalo
CCL2	Ligante 2 de quimiocina
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CREB	Elemento de ligação responsivo ao AMP cíclico
CS	Células de Schwann
DAX	Diâmetro do Axônio
DFN	Diâmetro da Fibra Nervosa
DIA	Diacereína
DRG	Gânglios da Raiz Dorsal
DW	Degeneração Walleriana
EBM	Espessura da Bainha de Melina
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPL	Comprimento da Pata do Lado Experimental
EPM	Erro padrão da média
EPO	Eritropoetina
ETS	Distância Total dos Dedos do Lado Experimental
FK506	Tacrolimus
FN	Fibra Nervosa
FO	Falso Operado
GAP43	Proteína associada ao crescimento
HE	Hematoxilina e eosina
IFD	Índice Funcional Dinâmico
IL – 1 $\beta$	Interleucina 1 beta

IL – 1ra	Antagonista do receptor de IL-1
IL – 4	Interleucina 4
IL – 10	Interleucina 10
IL – 11	Interleucina 11
IL – 13	Interleucina 13
L4-S1	Raízes Nervosas Lombossacrais
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LANDI	Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
LNI	Lesão do nervo isquiático
LNP	Lesão Nervosa Periférica
M1	Macrófagos de Fenótipo Pró-inflamatório
M2	Macrófagos de Fenótipo Anti-inflamatório
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MCP-1	Proteína Quimiotraente de Monócito 1
MMP-9	Metaloproteinase 9
NAC	N-acetilcisteína
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NPL	Comprimento da Pata do Lado Normal
NT – 3	Neurotrofina 3
NT – 4/5	Neurotrofina 4/5
NTS	Distância total dos dedos do lado normal
OA	Osteoartrite
p75 <sup>NTR</sup>	Receptor neurotrófico comum p75
PBS	Solução tampão fosfato
PE	Perineuro
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Quinase
PKA	Proteína Quinase A
PL	Comprimento da Pata
PLC-γ	Fosfolipase C Gama
PMP22	Proteína de Mielina Periférica 22

PO	Proteína Zero
QG	Quociente G
Rho-ROK	Via sinalização: Quinase associada a Rho
Ras-ERK	Via de sinalização: Proteína Ras-Quinase Regulada por Sinal Extracelular
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose tumoral Alfa
Trk	Receptor Quinase da Tropomiosina
TrkA	Receptor Quinase da Tropomiosina A
TrkB	Receptor Quinase da Tropomiosina B
TrkC	Receptor Quinase da Tropomiosina C
TRPV1	Potencial Receptor Transiente de Vanilóide 1
TS	Espalhar dos Dedos
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS .....	22
1.2	MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA .....	25
1.3	PROCESSO DE DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO.....	26
<b>1.3.1</b>	<b>Citocinas pró-inflamatórias na degeneração e regeneração nervosa periférica.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Fatores de crescimento na lesão nervosa periférica.....</b>	<b>31</b>
1.4	CONSEQUÊNCIAS DA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA .....	32
<b>1.4.1</b>	<b>Dor neuropática.....</b>	<b>32</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Alterações emocionais.....</b>	<b>34</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Déficits funcionais.....</b>	<b>35</b>
1.5	ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA A REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL .....	36
1.6	FARMACOLOGIA DA DIACEREÍNA: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS	40
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>47</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO.....	47
4.2	MODELO DE LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO .....	48
4.3	TRATAMENTO COM DIACEREÍNA.....	49
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	49
4.5	ETAPAS DA PESQUISA .....	50

4.6	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	53
4.6.1	<b>Hiperalgisia mecânica: Teste do filamento de Von Frey .....</b>	<b>53</b>
4.6.2	<b>Comportamento de guarda da pata (dor espontânea) .....</b>	<b>54</b>
4.6.3	<b>Hiperalgisia térmica ao frio – Teste da acetona.....</b>	<b>55</b>
4.6.4	<b>Teste do campo aberto.....</b>	<b>56</b>
4.6.5	<b>Índice funcional do nervo isquiático .....</b>	<b>57</b>
4.6.6	<b>Teste da escada horizontal .....</b>	<b>59</b>
4.6.7	<b>Teste de suspensão pela cauda .....</b>	<b>60</b>
4.6.8	<b>Teste de natação forçada - FST .....</b>	<b>61</b>
4.6.9	<b>Teste preferência por sacarose .....</b>	<b>62</b>
4.6.10	<b>Teste do Ninho .....</b>	<b>63</b>
4.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	64
4.8	QUANTIFICAÇÃO DE IL-1 $\beta$ E DO FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO ENCÉFALO .....	65
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	66
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
5.1	TRATAMENTO COM DIACEREÍNA REDUZ A HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS OU NÃO A LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO.....	67
5.2	EFEITO DA DIACEREÍNA NO COMPORTAMENTO DE GUARDA DA PATA (DOR ESPONTÂNEA) EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS OU NÃO À LNI.....	69
5.3	EFEITO DA DIACEREÍNA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS SUBMETIDOS OU NÃO AO ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO. ....	70
5.4	EFEITO DA DIACEREÍNA NA RECUPERAÇÃO MOTORA DE ANIMAIS SUBMETIDOS OU NÃO AO ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO.....	71
5.5	EFEITO DA DIACEREÍNA NA DISFUNÇÃO EMOCIONAL DO TIPO DEPRESSIVO CAUSADA PELO ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO.....	73
5.6	EFEITO DA DIACEREÍNA NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFERICA APÓS A LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIATICO.....	76

<b>5.6.1</b>	<b>Morfometria do nervo isquiático .....</b>	<b>76</b>
<b>5.6.2</b>	<b>Efeito da diacereína na regeneração nervosa periférica após lesão do nervo isquiático: análise morfológica. ....</b>	<b>77</b>
<b>5.7</b>	<b>EFEITO DA DIACEREÍNA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA IL-1<math>\beta</math> E DO FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DO ENCÉFALO (BDNF) NO NERVO ISQUIÁTICO. ....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC), composto pela medula espinal, tronco encefálico e encéfalo, e sistema nervoso periférico (SNP) formado pelos nervos periféricos que são compostos por feixes de fibras nervosas que fornecem uma via de comunicação entre o SNC e áreas periféricas do corpo (HUSSAIN et al., 2020), sendo responsáveis pela parte motora e sensitiva dos membros superiores e inferiores (GEUNA et al., 2009).

Contudo, os nervos são estruturas delicadas e suscetíveis a qualquer tipo de lesão (HUSSAIN et al., 2020). Estima-se que cerca de 3% de todos os pacientes que sofreram algum tipo de trauma apresentam lesões nos nervos periféricos e mais de 50.000 procedimentos relacionados com o reparo de nervos periféricos são realizados anualmente nos Estados Unidos (MODRAK et al., 2020).

Dentre os fatores etiológicos comumente descritos para as lesões nervosas periféricas (LNPs) incluem principalmente acidente automobilístico, assim como lesão penetrante, ferimento por arma de fogo, esmagamento, compressão, tração, isquemia, fraturas como de quadril, fêmur, tíbia e fíbula, lesões ocupacionais e lesões relacionadas a esportes (THATTE et al., 2019). Na cidade de São Paulo (SP – Brasil), 46% dos acidentes de trânsito geram alguma lesão no sistema nervoso periférico, e em outros países como Canadá o mesmo índice chega a 52% (CASTILLO-GALVÁN et al., 2014; KOUYOUMDJIAN, 2006).

Em termos de localização anatômica, os nervos comumente lesionados nos membros superiores incluem: ulnar, mediano e radial, juntamente com o plexo braquial, enquanto nos membros inferiores o nervo isquiático e o nervo fibular profundo são os mais envolvidos. Além disso, os estudos epidemiológicos constataam que a incidência de LNP traumática é maior no sexo masculino do que no feminino (em torno de 75% e 25%, respectivamente), sendo considerada uma causa importante de incapacidade em pessoas com idade entre 18 e 35 anos (CIARAMITARO et al., 2010; ESER et al., 2009; MIRANDA; TORRES, 2016).

No estudo de Kouyoumdjian, Graça e Ferreira (2017) foram avaliados exames de um total de 1.124 pacientes com LNP entre os anos de 1989 a 2014. Dentre os principais resultados verificaram que a média de idade dos pacientes foi de 34,2 anos. As LNPs foram mais frequentes no sexo masculino (76,7%) do que no sexo feminino

(23,3%). As lesões nos membros superiores representaram 72,6% dos casos, comprometendo principalmente nervos ulnar, plexo braquial, mediano e radial. Em 21,4% dos pacientes apresentaram lesões em membros inferiores, principalmente no nervo fibular e isquiático e 6% das lesões foram na face. A causa mais comum da LNP foi acidente veicular que representou quase metade de todos os casos (46,4%).

Os estudos também mostram que as LNPs podem resultar em grandes prejuízos sociais e econômicos (MODRAK et al., 2020). Dependendo da localização, intensidade e tipo de lesão nervosa, pode ocorrer uma recuperação incompleta do nervo. Neste caso, nota-se importante prejuízo sensório-motor juntamente com o aparecimento de dor neuropática. Essa condição leva a um impacto negativo nas atividades de vida diária e na qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela lesão, causando incapacidades físicas e ausências/absenteísmo no trabalho, sendo um fardo significativo para os pacientes e para o sistema de saúde (OSBORNE; ANASTAKIS; DAVIS, 2018; WANG et al., 2019; WOJTKIEWICZ et al., 2015).

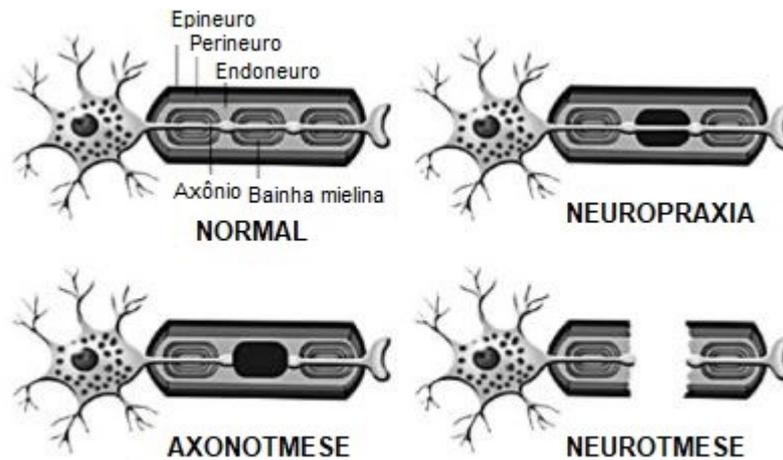
Apesar dos procedimentos diagnósticos modernos e técnicas microcirúrgicas avançadas (MODRAK et al., 2020), ainda existe certa dificuldade em encontrar tratamentos que melhorem as condições clínicas do paciente com lesão (HUSSAIN et al., 2020). Portanto, existe uma necessidade de novas estratégias terapêuticas para promover a recuperação funcional e aprimorar o reparo do nervo em pacientes com LNP (HUSSAIN et al., 2020; MODRAK et al., 2020).

## 1.1 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS

As LNPs foram classificadas de acordo com Seddon (1943) e Sunderland (1951). Segundo Seddon (1943) a classificação da lesão nervosa é separada em três tipos bem definidos: a neuropraxia que é a forma mais branda de lesão do nervo, com leve perda motora e sensitiva, não havendo dano aos axônios ou aos tecidos conjuntivos; a axonotmese, comumente vista em lesões por esmagamento, há perda da continuidade axonal e subsequente processo de degeneração do axônio distal à lesão, conhecido por degeneração Walleriana; e a neurotmese, em que o nervo é seccionado, ou seja, existe a separação completa do nervo em coto proximal e distal, com desorganização do axônio causada por uma fibrose tecidual com consequente interrupção do crescimento axonal. Na neurotmese a recuperação não é completa

sem intervenção cirúrgica (Figura 1) (CAILLAUD et al., 2019; CHUI et al., 2018; GRINSELL; KEATING, 2014; MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013).

Figura 1 – Classificação da LNP de acordo com Seddon (1943).



Legenda: Desenho esquemático que representa a fibra nervosa normal e os três graus de lesão do nervo: Neuropraxia, axonotmese e neurotmese. Fonte: adaptado de MARTINS et al. (2013).

No modelo proposto por Sunderland (1951), a classificação foi feita com base em características histopatológicas, e nos critérios eletrofisiológicos e clínicos ligados à capacidade de regeneração com ou sem intervenção cirúrgica. A partir disso, a LNP foi separada em cinco graus de severidade (Figura 2) (CHUI et al., 2018; GRINSELL; KEATING, 2014).

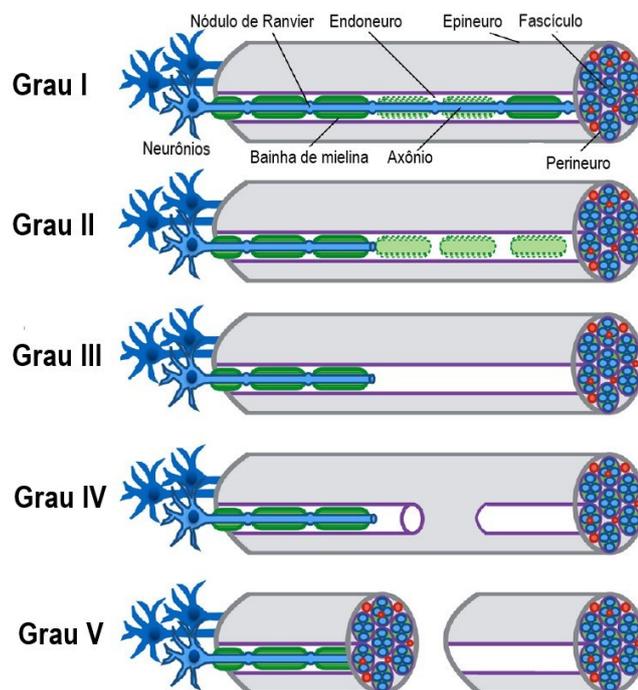
A lesão de primeiro grau é semelhante à neuropraxia de Seddon, que corresponde à compressão do nervo periférico, causada por pressão direta no tronco nervoso ou compressão da raiz nervosa, esse tipo de lesão afeta comumente os nervos que cruzam superfícies ósseas ou passam entre estruturas rígidas, como na síndrome do túnel do carpo (nervo mediano) (WAHAB et al., 2017) e na síndrome do túnel do tarso (nervo tibial) (DONEDDU et al., 2017). Outro exemplo é a lombociatalgia que é causada por inflamação ou compressão das raízes nervosas lombossacrais (L4-S1), as quais formam o nervo isquiático, ocasionando dor lombar que irradia para os membros inferiores e pode levar a déficits funcionais (CAILLAUD et al., 2019; JENSEN et al., 2019).

A lesão de segundo grau é equivalente a axonotmese, a qual é subdividida em mais dois graus de lesão: o terceiro grau, em que, além de ter lesão no axônio, há

também lesão no endoneuro, e o quarto grau que apresenta lesão no axônio, endoneuro e perineuro. Todos eles são considerados mais graves que o grau I e comumente essas lesões são causadas pelo esmagamento do nervo periférico e também podem ser induzidas por acidentes automobilísticos (CAILLAUD et al., 2019; CHUI et al., 2018; GRINSELL; KEATING, 2014).

Por fim, a lesão de quinto grau é semelhante à neurotme de Seddon, com secção completa do nervo, separando-o em coto proximal e distal, sendo esta lesão a mais grave de todas. A causa mais frequente é a secção transversal ou laceração dos nervos periféricos, por meio de um objeto cortante (por exemplo, faca e vidro quebrado etc.). Para reparar este tipo de lesão é necessária uma intervenção cirúrgica, como a implantação de um autoenxerto. Outra solução, no caso de perda de tecido, é a implantação da reconstrução tubular utilizando materiais biológicos e/ou materiais sintéticos (CAILLAUD et al., 2019).

Figura 2 – Classificação da LNP de acordo com Sunderland (1951).



Legenda: Desenho esquemático que representa os diferentes graus de lesão da classificação de Sunderland. Grau I: interrupção temporária da bainha de mielina sem perda da continuidade axonal. Grau II: Perda de continuidade do axônio e de sua bainha de mielina, os tecidos conjuntivos do nervo estão preservados. Grau III: o axônio e o endoneuro estão lesionados. Grau IV: o axônio, o endoneuro e o perineuro estão lesionados. Grau V: o nervo é seccionado. Fonte: adaptado de CAILLAUD et al. (2019).

## 1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Pesquisas sobre lesão nervosa periférica têm o objetivo de acompanhar as alterações morfológicas e moleculares que ocorrem em todo o nervo durante o processo de lesão e de regeneração (GEUNA, 2015; MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013). Para isso, existem diferentes modelos que utilizam animais com o intuito de pesquisar a regeneração do nervo periférico (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

Nesses trabalhos, os roedores (ratos e camundongos) são os animais mais utilizados, pois seu sistema fisiológico e a distribuição de troncos nervosos são semelhantes aos humanos. Além disso, o uso desses animais é considerado uma abordagem interessante por possibilitar o estudo de mecanismos e vias relacionadas à regeneração (MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013; SAVASTANO et al., 2014).

Este tipo de lesão continua sendo pesquisado em uma grande variedade de nervos como no nervo isquiático, femoral, facial, mediano etc. Dentre eles, o principal nervo encontrado nesses estudos é o nervo isquiático (GEUNA, 2015; MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013). Em roedores, o nervo isquiático é predominantemente composto pelas raízes nervosas de L3 a L5, e aproximadamente na fossa poplítea se divide em nervo tibial, fibular e sural, seu tronco nervoso apresenta um comprimento considerável o que facilita a procedimento cirúrgico (RIGAUD et al., 2008; RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

Após as LNPs, a capacidade de regeneração dos axônios e da recuperação funcional depende do local, do tipo e da gravidade da lesão e isto irá determinar a necessidade ou não da intervenção cirúrgica. Os tipos mais comuns de lesão em modelo experimental são: esmagamento do nervo que leva a uma axonotmese e a transecção completa do nervo (neurotmese) (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004).

No modelo de esmagamento do nervo isquiático a lesão ocorre por meio de uma pinça cirúrgica serrilhada ou não serrilhada, sem lesionar a estrutura conectiva do nervo (especialmente o epineuro), ou seja, os segmentos proximais e distais ao local da lesão permanecem conectados, permitindo que os axônios se regenerem e atinjam seus alvos musculares (CAILLAUD et al., 2019; GEUNA, 2015).

A desvantagem deste modelo experimental é a taxa de regeneração, em animais é mais rápida, ou seja, a resolução da lesão ocorre em poucas semanas, diferente do que é encontrada em humanos. Mesmo assim, é um modelo experimental muito utilizado e adequado para estudar as alterações relacionadas com a regeneração nervosa, tanto em nível celular como em nível molecular, ao longo do tempo (ALVITES et al., 2018)

Todavia, este modelo também possui vantagens, após a lesão os animais também apresentam dor neuropática e déficits funcionais, que são consequências comuns e observadas nas LNP em humanos (ALVITES et al., 2018; IRINTCHEV, 2011). De acordo com a classificação, a axonotmese é o segundo tipo de lesão mais encontrado entre os pacientes acometidos com a LNP, o que permite uma translação do modelo animal com a clínica (ALVITES et al., 2018; CASTILLO-GALVÁN et al., 2014).

Diante disto, o modelo torna-se o mais adequado para o estudo da regeneração de nervos periféricos, bem como para traçar estratégias de tratamento para quadro algico, déficits funcionais e para possibilitar e/ou acelerar o processo de reparo do nervo lesionado (GEUNA, 2015; MENORCA; FUSSELL; EL FAR, 2013).

### 1.3 PROCESSO DE DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO

Quando ocorre uma lesão no nervo periférico acontece uma complexa rede de respostas multicelulares que geram alterações fisiológicas e metabólicas que compreende principalmente a região proximal e a região distal à lesão (DEFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015; HUSSAIN et al., 2020). Na parte proximal do axônio, inicia-se a formação de cones de crescimento em direção a região desnervada. Já na região distal à lesão ocorre a degeneração Walleriana (DW), esse processo inicia-se em torno de 24 a 48 horas após a lesão e é uma forma única e estruturada de degeneração dos axônios, etapa importante para dar início a regeneração do nervo periférico (Figura 3 e 4) (CAILLAUD et al., 2019; HUSSAIN et al., 2020).

Os neutrófilos, macrófagos e linfócitos T, fazem parte do grande número de células imunes que são recrutadas após a lesão (CHEN; PIAO; BONALDO, 2015). O recrutamento dessas células ocorre dentro de horas, dias ou semanas e são

responsáveis pela fagocitose e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011) (Figura 4).

Além das células imunes, as células de Schwann (CS) são consideradas as principais células que desempenham um papel fundamental na degeneração Walleriana (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011). Primeiramente, as CS presentes no segmento distal da lesão iniciam um processo de diferenciação. Dentro de 48 horas, essas células regulam negativamente as proteínas da mielina (como a proteína de mielina periférica (PMP22) e a proteína zero (PO)) e se proliferam rapidamente para regular a expressão gênica de uma infinidade de moléculas (como algumas citocinas e fatores neurotróficos) que irão auxiliar no processo de degeneração e reparo (MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013).

Diante disto, as células de Schwann apresentam uma função inicial que é auxiliar na fagocitose de resíduos axonais e de mielina, esses restos de mielina contêm moléculas, como a glicoproteína associada à mielina (MAG), que atuam como uma barreira para a regeneração pois inibem o crescimento axonal (BURNETT; ZAGER, 2004; GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011).

Além de proliferarem e fagocitarem os detritos, as CS secretam fatores tróficos, citocinas e quimiocinas, tendo como objetivo recrutar células imunes, como mastócitos e macrófagos para o local da lesão (CHEN; PIAO; BONALDO, 2015). A proteína quimiatraente de monócito 1 (MCP-1), também conhecida como ligante 2 de quimiocina (CCL2), o fator inibidor de leucemia (LIF), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) são exemplos de mediadores secretados pelas CS e que favorecem o recrutamento dos macrófagos ao tecido lesionado (CAILLAUD et al., 2019; MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013). Adicionalmente, os macrófagos infiltrados nos nervos lesionados também expressam e produzem vários fatores, como CCL2, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , contribuindo assim para o recrutamento adicional de monócitos/macrófagos no início da lesão (CHEN; PIAO; BONALDO, 2015) (Figura 4).

Esse recrutamento, acúmulo e ativação de macrófagos, ocorre por volta do 2º e 3º dia após a lesão, como resultado da onda inflamatória inicial, e atingem níveis máximos no 7º e 14º dia após a lesão, sendo que a migração dessas células ocorre principalmente por via hematopoiética, passando pelas paredes dos capilares (MIETTO; MOSTACADA; MARTINEZ, 2015; ROTSHENKER, 2011). Os macrófagos, realizam a fagocitose dos detritos celulares juntamente com as células de Schwann,

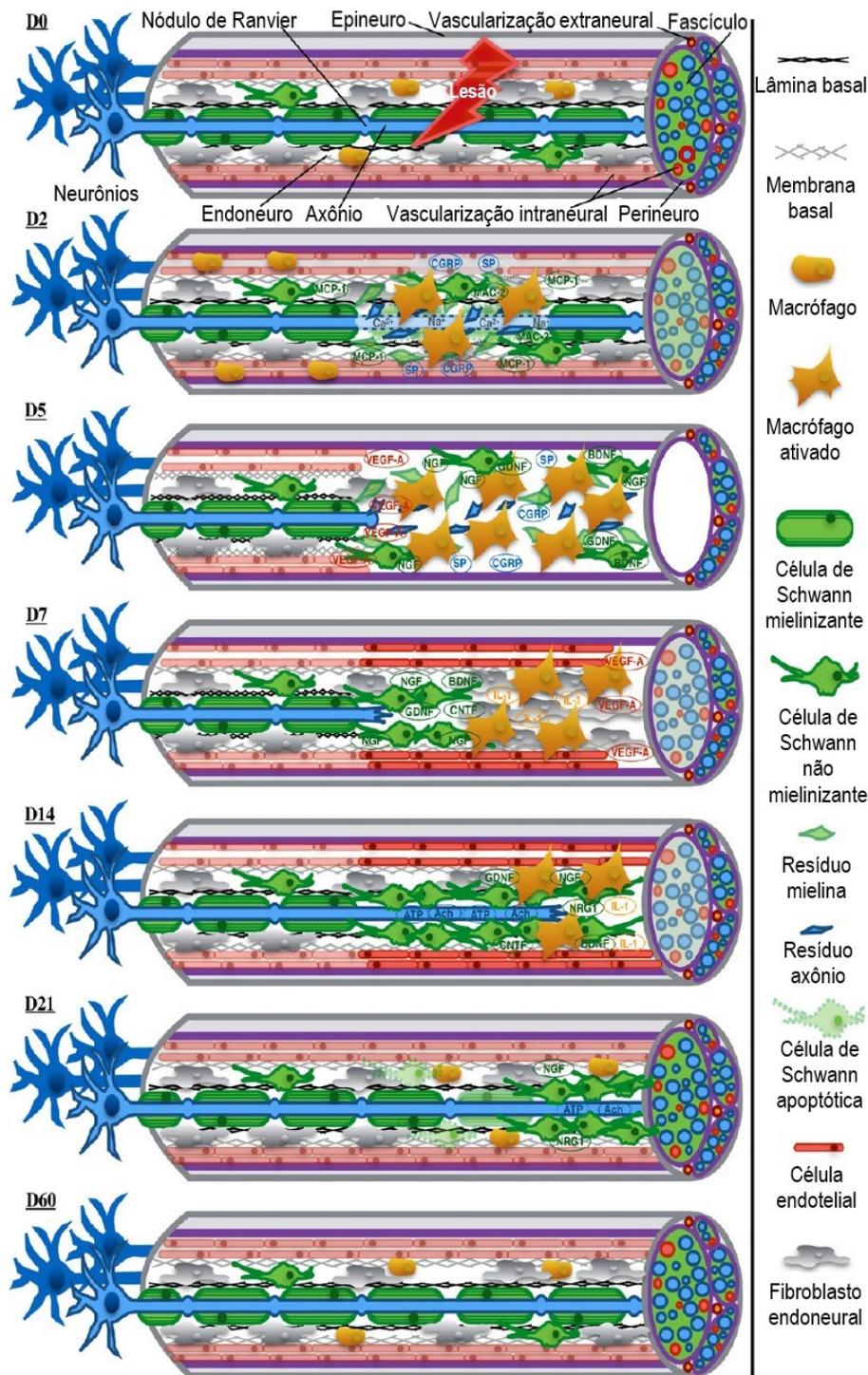
aumentando drasticamente a taxa de remoção desses detritos celulares no coto do nervo distal lesionado (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; MIETTO; MOSTACADA; MARTINEZ, 2015). Evento considerado importante para criar o ambiente mais propício para o crescimento axonal (CATTIN; LLOYD, 2016).

Além disso, os macrófagos também podem ser agrupados em fenótipo pró-inflamatório (M1) e fenótipo anti-inflamatório (M2). Os macrófagos M1 estão presentes nos estágios iniciais da LNP e são responsáveis pela ativação da resposta inflamatória, e aproximadamente uma semana após a lesão os macrófagos nos locais da lesão começam a ser polarizados para o fenótipo M2, os quais podem contribuir com a remodelação e reparo do tecido nervoso (DEFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015).

Não obstante, as trilhas de regeneração é outro fenômeno importante que ocorre durante o processo da recuperação da lesão nervosa. Para tal, no processo de reparo as CS adotam uma morfologia alongada permitindo que se alinhem para formar uma coluna ao redor do axônio, esse alinhamento é denominado de bandas de Büngner, sendo um substrato essencial para orientar o crescimento axonal (JESSEN; MIRSKY; LLOYD, 2015).

Por fim, a combinação do conjunto de características pró-regenerativas, a regulação negativa da produção de mielina que resulta em um novo fenótipo para a CS e o recrutamento de células imunes (como os macrófagos) para o local da lesão, desempenham um papel importante no processo de degeneração e regeneração axonal (JESSEN; MIRSKY; LLOYD, 2015; ROTSHENKER, 2011).

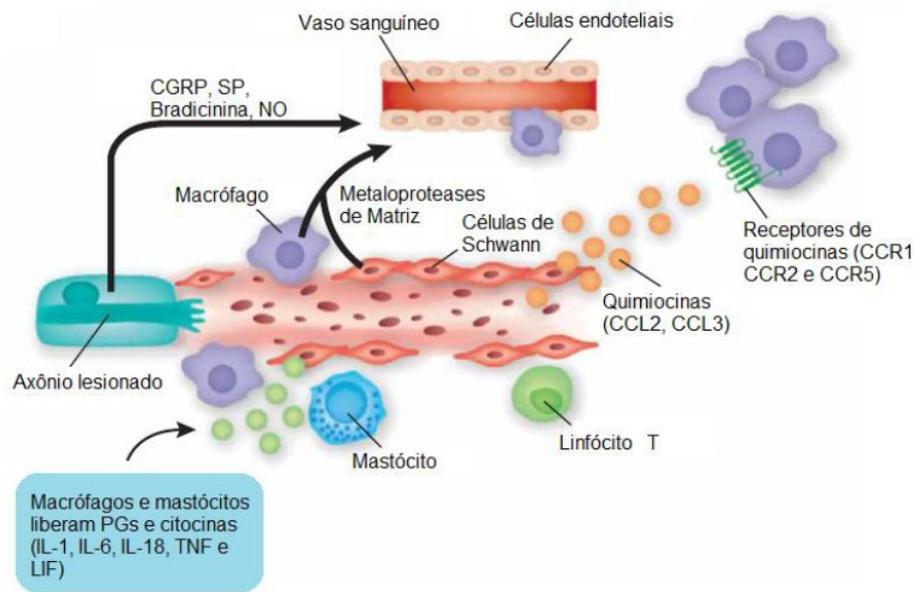
Figura 3 – Eventos celulares após lesão do nervo periférico – Degeneração Walleriana.



Legenda: Representação esquemática da degeneração Walleriana e da regeneração. D0: representa o momento em que o nervo periférico foi lesionado. D2: Dois dias após a lesão, mostra a degeneração Walleriana, onde os axônios começam a se degenerar, as células de Schwann (CS) se tornam ativadas e ocorre a migração de macrófagos para o local da lesão para realizarem a fagocitose. D5: Cinco dias após a lesão, mostra os macrófagos e as CS continuando a limpeza do coto distal por meio da fagocitose de restos axonais e de mielina. D7: Sete dias após a lesão, mostra os fatores de crescimento como o NGF e BDNF, os quais irão auxiliar no reparo do nervo. D14 e D21: Do dia 14 até o dia 21,

mostra o alinhamento das CS para formar as bandas de Büngner que irão guiar o recrescimento axonal. D60: Dois meses após a lesão o nervo apresenta uma aparência quase normal, com seu axônio, bainha de mielina e envoltórios conjuntivos (endoneuro, perineuro e epineuro). Fonte: adaptado de CAILLAUD et al. (2019).

Figura 4 – Eventos inflamatórios ativados após LNP



Legenda: Alterações inflamatórias na degeneração walleriana. Metaloproteases de matriz são produzidas por macrófagos e CS aumentando a permeabilidade da barreira hematoneural. Além disso, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a substância P, a bradicinina e óxido nítrico são liberados após a lesão e induzem hiperemia e edema, promovendo a migração celular (como de monócitos e linfócitos T). As quimiocinas CCL2 e CCL3 atraem e guiam os monócitos/macrófagos para o local da lesão. Macrófagos e mastócitos liberam prostaglandinas e as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$  e LIF. O TNF- $\alpha$  tem efeito autócrino sobre os macrófagos e aumenta a síntese e a liberação de citocinas. O TNF também promove mais infiltração de macrófagos. Fonte: Adaptado de Scholz e Woolf (2007).

### 1.3.1 Citocinas pró-inflamatórias na degeneração e regeneração nervosa periférica

Como comentado anteriormente, algumas citocinas são liberadas pelas CS e macrófagos após a lesão do nervo periférico (CAILLAUD et al., 2019). Na fase de degeneração as citocinas pró-inflamatórias desencadeiam a destruição tecidual, ativam células para produzir quantidades maiores de mediadores inflamatórios e recrutam leucócitos para o local da lesão. Esse ciclo de retroalimentação da fragmentação do nervo, proliferação celular, influxo de células imunológicas e liberação de citocinas mantém o processo inflamatório por longos períodos após a lesão (MIETTO; MOSTACADA; MARTINEZ, 2015).

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são exemplos de citocinas pró-inflamatórias que mais atuam na lesão do nervo periférico (ROTSHENKER, 2011). Elas são liberadas primeiramente pelas CS, que são as primeiras células não neuronais a responder à axonotmese. Diante disto, as CS regulam rapidamente a expressão e a produção de TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ . A secreção de TNF- $\alpha$  é detectada dentro de 5 a 6 horas após a lesão. Já a IL-1 $\beta$ , tem sua secreção detectada entre 5 a 10 horas após a lesão, atingindo níveis máximos em 24 horas, sendo seguida por um pico no 14º dia após a lesão (DEFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015; MIETTO; MOSTACADA; MARTINEZ, 2015).

De acordo com a literatura, após uma LNP os níveis aumentados de TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  estão presentes tanto no nervo isquiático como em regiões do sistema nervoso central (SNC), como o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (GUI et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2015). Esse intenso processo inflamatório desencadeado após a lesão está envolvido na geração e manutenção da dor neuropática com a presença de hiperalgesia e ou alodinia, além de estar relacionado com a depressão (FAROOQ et al., 2017; LEES et al., 2015).

### **1.3.2 Fatores de crescimento na lesão nervosa periférica**

Na LNP também ocorre produção de diferentes fatores neurotróficos que são peptídeos responsáveis por manter o crescimento e a sobrevivência dos axônios, e também de neurônios motores e sensitivos após danos teciduais (LYKISSAS et al., 2007; ROTSHENKER, 2011).

O fator de crescimento do nervo (NGF), as proteínas associadas ao crescimento (GAP43), o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), a neurotrofina-4/5 (NT-4) e neurotrofina-3 (NT-3), são exemplos de fatores neurotróficos liberados, principalmente pelas CS, após uma LNP (FAWCETT; VERHAAGEN, 2018; MIETTO; MOSTACADA; MARTINEZ, 2015).

Com relação ao BDNF, ele é considerado uma neurotrofina importante nesse processo de reparo tecidual. Essa neurotrofina pode ser encontrada em níveis baixos no nervo periférico sem lesão e, após um trauma no nervo, sua expressão aumenta na tentativa de sustentar a sobrevivência e o crescimento dos axônios (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; MCGREGOR; ENGLISH, 2019). Outros estudos mostram

que a administração de BDNF exógeno também promove o recrescimento axonal (LYKISSAS et al., 2007; ZHENG et al., 2016).

De uma maneira geral, esses fatores de crescimento medeiam seus efeitos na fibra nervosa após ligarem-se a receptores específicos, como o receptor quinase da tropomiosina (Trk) e o receptor neurotrófico comum p75 (p75<sup>NTR</sup>). O último é classificado como um receptor de baixa afinidade para as neurotrofinas. Por outro lado, a família de receptores Trk é mais específica: o NGF liga-se ao trkA, o BDNF e a NT-4/5 ligam-se ao trkB e a NT-3 liga-se ao trkC (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; BOYD; GORDON, 2003).

A ligação das neurotrofinas aos seus receptores resulta na ativação de várias vias de sinalização intracelular. Mais especificamente, quando as neurotrofinas se ligam aos receptores Trk, três principais enzimas são ativadas e consideradas as principais reguladoras do crescimento axonal: a proteína quinase A (PKA), o fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3K) e a fosfolipase C gama (PLC- $\gamma$ ). Diante disto, as neurotrofinas apresentam papel importante na regeneração nervosa (LYKISSAS et al., 2007).

#### 1.4 CONSEQUÊNCIAS DA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Como visto anteriormente, as principais consequências da LNP são a presença de dor neuropática e de déficits funcionais que prejudicam a qualidade de vida e geram grande incapacidade física nos indivíduos acometidos com esse tipo de lesão (HUSSAIN et al., 2020).

##### 1.4.1 Dor neuropática

A dor é definida pela Associação Internacional do Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain*, IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a, dano real ou potencial ao tecido”. Então a dor é uma experiência pessoal que é influenciada em vários graus por fatores biológicos, psicológicos e sociais (RAJA et al., 2020).

Quando a dor é aguda, possui um valor biológico importante de preservação da integridade do indivíduo, pois é um sintoma que alerta para ocorrências de lesões

no corpo. A dor crônica, por sua vez, não possui essa característica. Por causar absenteísmo, incapacidade temporária ou permanente, morbidade e elevados custos ao sistema de saúde, a dor crônica, tem sido considerada um problema de saúde pública, a qual gera um grande impacto socioeconômico (NETO et al., 2009; YALCIN; BARTHAS; BARROT, 2014). Em geral, caracteriza-se dor crônica quando ela permanece por mais de três meses. Estima-se que a prevalência de dor crônica no mundo atinge em média 35,5% da população e no Brasil é uma condição clínica frequente afetando em torno de 41% da população (POSSO et al., 2016; VASCONCELOS; ARAÚJO, 2018).

Um dos principais tipos de dor crônica é a dor neuropática, a qual é causada por uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial, e pode estar relacionada com distúrbios metabólicos (por exemplo, neuropatia periférica diabética), neuropatia relacionada a infecção (por exemplo, neuralgia pós-herpética), doenças autoimunes do sistema nervoso (por exemplo, esclerose múltipla) e lesão traumática do sistema nervoso central e periférico (por exemplo, lesões da medula espinal e cialgia, respectivamente) (ALLES; SMITH, 2018; LEES et al., 2015; TUTOGLU et al., 2015; YALCIN; BARTHAS; BARROT, 2014). Sendo que a prevalência de dor neuropática pode chegar a 17,9% da população em geral (VAN HECKE et al., 2014).

Dependendo da gravidade da lesão/doença que gera a dor neuropática, a população acometida pode apresentar alguns sintomas que incluem dor espontânea, alodinia (percepção da dor de estímulos inócuos), hiperalgesia (percepção aumentada da dor de estímulos nocivos), parestesia ou disestesia (formigamento, agulhadas, sensação de queimação e choque elétrico) e hipoestesia (diminuição da sensibilidade) (TODOROVIC; JEVTOVIC-TODOROVIC, 2013; YALCIN; BARTHAS; BARROT, 2014).

A dor também engloba o componente afetivo que inclui sentimentos de aborrecimento, tristeza, e depressão em resposta a um estímulo nocivo. A partir disso, sabe-se que a dor neuropática pode estar associada com as alterações emocionais (depressão e falta de motivação), prejudicando a qualidade de vida do indivíduo acometido (DOAN; MANDERS; WANG, 2015; LEES et al., 2015; MACHELSKA, 2011).

Como discutido anteriormente, na LNP as células do sistema imune (mastócitos, macrófagos, CS) coordenam uma resposta inflamatória que visa a defesa

contra patógenos e a reparação do tecido nervoso. Essas células imunes ativadas secretam metaloproteases e mediadores vasoativos, aumentando assim a permeabilidade dos vasos sanguíneos locais, e expressam quimiocinas que recrutam mais neutrófilos circulantes, macrófagos derivados de monócitos e linfócitos. Durante esse processo, algumas células liberam citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e mediadores inflamatórios, incluindo trifosfato de adenosina (ATP), histamina, substância P, bradicinina, prostaglandinas e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, sendo que essas alterações podem sensibilizar os nociceptores, promover hiperalgesia e alodinia, o que contribui para a dor neuropática (LEES et al., 2015; NICKEL et al., 2012).

A inflamação contínua leva a uma resposta imune adaptativa e à infiltração de células T, as quais contribuem para o desenvolvimento e progressão da dor neuropática em modelos animais, particularmente pela secreção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, as células T também expressam citocinas anti-inflamatórias importantes para minimizar a hipersensibilidade à dor, auxiliando na resolução da inflamação e restauração da homeostase. Portanto, a secreção de citocinas pelas células imunes inatas e adaptativas desempenha um papel importante na regulação do ambiente inflamatório e na modulação do desenvolvimento e progressão da dor neuropática (LEES et al., 2015).

#### **1.4.2 Alterações emocionais**

Distúrbios envolvendo o sistema nervoso periférico, como no caso das LNPs, podem ter impacto negativo nas atividades de vida diária e no bem-estar dos pacientes (WOJTKIEWICZ et al., 2015). Os estudos epidemiológicos mostram que os níveis aumentados de dor e incapacidade física são fatores preditivos para pontuações baixas em questionários que avaliam a qualidade de vida (CIARAMITARO et al., 2010; WOJTKIEWICZ et al., 2015).

Como foi relatado anteriormente, a dor neuropática também é acompanhada por déficits emocionais e cognitivos, sendo que a depressão e a dor compartilham um alto grau de comorbidade (DOAN; MANDERS; WANG, 2015; FONSECA-RODRIGUES et al., 2020). No estudo de Ohayon e Schatzberg (2010), verificaram a relação de dor e transtorno depressivo, alguns resultados mostraram que 66,3% dos

indivíduos com depressão relataram ter dor crônica. Em 57,1% dos casos, a dor apareceu antes do episódio depressivo. Além disso, indivíduos depressivos com dor intensa, acabam apresentando insônia severa, retardo psicomotor, sentimentos de inutilidade ou culpa, fadiga e dificuldade de concentração.

Os estudos pré-clínicos também indicam que a dor e depressão estão relacionadas e que a depressão pode piorar os comportamentos de dor (DOAN; MANDERS; WANG, 2015). Nas pesquisas experimentais que envolvem LNP, como no modelo de constrição crônica do nervo, mostram que além da dor neuropática os animais apresentam comportamento de desesperança e anedonia, sintomas que estão associados com a depressão em humanos, além de apresentarem déficits cognitivos (FONSECA-RODRIGUES et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2015).

Diante disto, compreender o mecanismo envolvido na lesão nervosa periférica que leva a alterações emocionais, permitirá que novas alternativas terapêuticas sejam feitas para melhorar a qualidade de vida e favorecer a recuperação funcional (CIARAMITARO et al., 2010; DOAN; MANDERS; WANG, 2015).

### **1.4.3 Déficits funcionais**

Além do quadro algico, muitos pacientes apresentam uma recuperação motora incompleta, com perda parcial ou total da função motora, pois nem sempre a regeneração traz resultados funcionais bem-sucedidos após as lesões nervosas (GRINSELL; KEATING, 2014; HÖKE, 2006).

De uma maneira geral, a regeneração e a recuperação funcional irão depender do grau de degeneração, do processo inflamatório e da gravidade inicial da lesão. Nas lesões de primeiro grau (neuropraxia) as alterações patológicas são leves ou ausentes, onde ocorre apenas o bloqueio da condução nervosa, sem a presença de degeneração do nervo e dificilmente ocorre prejuízo motor (BURNETT; ZAGER, 2004).

Em lesões de segundo grau, como na axonotmese, existe pouca alteração histológica no local ou próximo da lesão, entretanto, na região distal a alteração histológica envolve a fragmentação dos axônios e da mielina. Existe a presença de um processo inflamatório, e neste tipo de lesão os déficits funcionais estão presentes (BURNETT; ZAGER, 2004; CAILLAUD et al., 2019).

Por outro lado, as lesões de terceiro grau (neurotmesa), envolvem a retração das extremidades das fibras nervosas. O trauma vascular local gera hemorragia e edema, que resultam em uma intensa resposta inflamatória. Os fibroblastos proliferam e ocorre uma cicatriz fibrosa densa no segmento lesionado, nesses casos a lesão é mais grave, sendo necessário o reparo cirúrgico para tentar restaurar as funções sensorio-motoras (CAILLAUD et al., 2019).

Além da gravidade da lesão, quando ocorre um trauma, o nervo apresenta uma taxa de crescimento axonal em torno de 1 a 2 mm/dia, ou seja, o processo de regeneração é lento. Diante disto, a inervação dos músculos torna-se comprometida prejudicando o retorno da função motora (CHAN et al., 2014; HÖKE, 2006; SIQUEIRA, 2007). Portanto, acelerar o processo de regeneração dos axônios seria ideal para uma completa recuperação funcional (GRINSELL; KEATING, 2014).

## 1.5 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA A REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL

Atualmente, houve diversos avanços significativos na regeneração do nervo periférico em humanos, no que diz respeito a otimização de técnicas cirúrgicas (HÖKE, 2006). Até o momento não existem medicamentos disponíveis na clínica para acelerar a regeneração nervosa. No entanto, diversas moléculas como, peptídeos, hormônios, fatores de crescimento têm sido apresentados como substâncias potenciais para melhorar e acelerar o reparo do tecido nervoso, minimizando a morte neuronal e promovendo o crescimento axonal, o que leva a uma recuperação funcional após a lesão nervosa (PANAGOPOULOS; MEGALOKONOMOS; MAVROGENIS, 2017).

Dentre as substâncias/fármacos que apresentam esse poder regenerativo as principais são: acetil L-carnitina (ALCAR), tacrolimus (FK506), eritropoetina (EPO), N-acetilcisteína (NAC), ibuprofeno, propionato de testosterona e metilcobalamina (vitamina B12) (Quadro 1), as quais podem atuar ativando ou inibindo diversas vias moleculares, como a fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B (PI-3K/Akt), quinase regulada por sinal extracelular (Ras-ERK), adenosina monofosfato cíclico/proteína quinase A (AMPc/PKA) e quinase associada a Rho (Rho-ROK), as

quais estão relacionadas com a regeneração do tecido nervoso (CHAN et al., 2014; PANAGOPOULOS; MEGALOIKONOMOS; MAVROGENIS, 2017).

A via de sinalização PI3K/Akt é uma via de sobrevivência celular e é ativada, por exemplo, quando o fator de crescimento do nervo (NGF) se liga a seu receptor Trk. Isso promove a ativação de proteínas adaptadoras como Gab-1 e Ras, que fosforilam e ativam, respectivamente, a Akt e ERK-1/2. Essas moléculas inibem a apoptose e estimulam o crescimento de neuritos e a montagem do citoesqueleto (BOTA; FODOR, 2019; CHAN et al., 2014).

A ativação do AMPc intracelular também auxilia no processo de regeneração. Quando ativado gera a formação de PKA que por meio da inibição da Rho-A GTPase bloqueia os efeitos da MAG (glicoproteína que inibe o crescimento do nervo). Além disso, o AMPc e a PKA regulam positivamente a arginase I por meio da fosforilação de CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc) e isso promove a síntese de poliaminas, auxiliando no crescimento axonal (CHAN et al., 2014).

Após a lesão do nervo periférico, a RhoA GTPase juntamente com a quinase associada a Rho (ROK), tem o papel de inibir o crescimento do axônio e, portanto, causa um bloqueio na regeneração. Diante disto, alternativas farmacológicas podem ser utilizadas para bloquear os efeitos dessa via e assim auxiliar o crescimento neuronal (CHAN et al., 2014).

A maior parte dos estudos que utilizam as substâncias/fármacos citados anteriormente, e que podem atuar nessas vias regenerativas, ainda estão em fase inicial (pré-clínica). Entretanto, a Acetil-L-carnitina (ALCAR) e o tacrolimus já apresentaram algum resultado na pesquisa clínica (BOTA; FODOR, 2019; CURRAN et al., 2019; PHAN; SCHUIND, 2012).

ALCAR é um peptídeo mitocondrial envolvido no transporte de lipídios e demonstrou ser eficaz na neuroproteção do sistema nervoso central e na regeneração do nervo periférico. Foi aplicado clinicamente a várias neuropatias periféricas sistêmicas, incluindo neuropatia diabética, neuropatia tóxica anti-retroviral e neuropatia periférica induzida por quimioterapia. Seus efeitos podem estar relacionados com a regulação positiva da tirosina quinase A e ERK-1/2 e à diminuição de proteínas apoptóticas como caspase-3. Além de demonstrar, uma melhora na recuperação funcional e histológica em estudos experimentais de LNP (BOTA; FODOR, 2019; CHAN et al., 2014).

Na fase clínica, Curran et al., (2019) desenvolveram um estudo clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo para avaliar o efeito do ALCAR na síndrome do túnel do carpo grave. Vinte pacientes foram separados para receber o tratamento com ALCAR ou placebo. Contudo, verificaram que ALCAR não apresentou benefícios superior ao placebo para esses pacientes.

Com relação ao Tacrolimo (FK506), um imunossupressor utilizado para suprimir a rejeição de transplantes como de fígado e rins, começou a ser pesquisado em pacientes com lesão do nervo periférico, já que em estudos pré-clínicos observou-se melhora na regeneração nervosa, induzindo a proliferação de CS e melhorando o reparo axonal. O mecanismo exato de seu efeito regenerativo permanece incerto, mas, sugere-se o aumento da expressão da proteína associada ao crescimento (GAP-43) e do fator de crescimento transformador 1 beta (TGF-1 $\beta$ ) (PANAGOPOULOS; MEGALOIKONOMOS; MAVROGENIS, 2017).

No estudo de fase II, Phan e Schuind (2012) analisaram a tolerância e o efeito do FK506 após o reparo do nervo, por meio de sutura ou autoenxerto. Os pacientes que participaram do estudo receberam FK506 (via oral) por 60 dias. A dose inicial utilizada foi de 0,075 mg/kg por dia (dividida em duas doses por dia), e a dose oral foi ajustada com base nas concentrações sanguíneas monitoradas constantemente. Ao final do estudo, foi demonstrado que nenhum efeito colateral indesejável foi observado durante ou após o tratamento, já que em altas doses este fármaco pode ser tóxico, entretanto, o FK506 não apresentou evidências significativas de que acelera a regeneração nervosa em pessoas com lesão do nervo periférico.

Diante disto, observa-se que há pouco avanço no tratamento com fármacos para a regeneração nervosa. Assim, buscam-se alternativas terapêuticas que minimizem os danos causados pela LNP e que acelerem a regeneração nervosa para melhorar a funcionalidade e a qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

Quadro 1 – Opções terapêuticas para regeneração do nervo periférico

<b>Intervenção</b>	<b>Propriedades clínicas</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Efeitos observados</b>
<b>Acetil L-carnitina</b>	Antioxidante	Aumenta neurotrofinas; Regula positivamente a tirosina quinase A, e ERK 1/2; diminui expressão de proteínas apoptóticas (Ex.: caspase-3)	Neuroproteção; Aumenta o número e o diâmetro dos axônios e aumenta a espessura da bainha de mielina
<b>Tacrolimus (FK506)</b>	Imunossupressor; Diminui o risco de rejeição dos órgãos após o transplante	Ativação da ERK; Ativação da GAP-43 e TGF-1 $\beta$ ; Induz a proliferação CS e remove os detritos de mielina	Aumenta o número de axônios mielinizados, a espessura da mielina e o brotamento axonal; Neuroproteção; Taxa de regeneração axonal aumenta
<b>Eritropoetina</b>	Hormônio; Estimula a hematopoese. Utilizada para tratar anemia na insuficiência renal crônica	Ativa receptor EPO; Aumenta peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); Ativação PI3K/Akt, Jak-STAT e NF $\kappa$ B	Aumenta diâmetro do axônio, da bainha de mielina e o número de fibras nervosas; Melhora a recuperação funcional;
<b>N - acetilcisteína</b>	Utilizado como agente mucolítico em doenças respiratórias	Ativa Ras-ERK e JAK-STAT; Regula negativamente caspase-3 (proteína pró-apoptótica)	Neuroproteção - diminui a morte neuronal; Promove a regeneração nervosa sensorial através de enxerto
<b>Ibuprofeno</b>	Anti-inflamatório não esteroide (AINE)	Inibe cascata de sinalização RhoA	Melhora recuperação funcional; Aumenta a área e espessura dos axônios mielinizados
<b>Propionato de Testosterona</b>	Esteróide anabolizante - andrógeno	Atenua a expressão de GFAP; Aumenta a expressão de BDNF; Regulação positiva de GAP-43	Auxilia na recuperação funcional; Acelera taxa de regeneração
<b>Metilcobalamina (Vitamina B12)</b>	Anemia	Ativação ERK 1/2 e Ark	Auxilia na recuperação funcional e na mielinização axonal

Fonte: (BOTA; FODOR, 2019; CHAN et al., 2014; FERNANDEZ et al., 2018; PANAGOPOULOS; MEGALOIKONOMOS; MAVROGENIS, 2017).

## 1.6 FARMACOLOGIA DA DIACEREÍNA: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS

A diacereína (ácido 4,5-diacetoxi-9,10-dihidro-9,10-dioxi-2-antracenocarboxílico) é derivado de uma antraquinona encontrada em plantas do gênero *Cássia* com moderada atividade analgésica e anti-inflamatória e seu metabólito ativo é a reína (ácido carboxílico 4,5-bi (oxiacetil) 9,10-dioxi-2 antraceno). Sendo que, a diacereína é totalmente convertida em reína antes de atingir a circulação sistêmica e esta é eliminada pela via renal (MARTEL-PELLETIER; PELLETIER, 2010).

Em geral, esta droga é administrada por via oral, na dose de 50 mg, duas vezes ao dia. Sabe-se que o pico de concentração ocorre em 2,5 horas e a meia vida para eliminação é de 4,5 horas. Ainda, a diacereína apresenta um efeito residual de 4 a 8 semanas após a interrupção do tratamento (CONCEIÇÃO et al., 2012; NICOLAS et al., 1998; PANOVA; JONES, 2015; PELLETIER et al., 2000). Este medicamento não afeta a síntese de prostaglandinas, portanto, não tem efeito deletério no trato gastrointestinal. Entretanto, pode apresentar como efeito adverso diarreia leve a moderada. Além disso, pode alterar a coloração da urina para um amarelo-intenso sendo que este fato acontece devido à eliminação dos metabólitos da diacereína no trato urinário e não tem significado clínico (PANOVA; JONES, 2015).

Foi desenvolvida principalmente para o tratamento da osteoartrite (OA), a forma mais comum de artrite, a qual é caracterizada por uma degradação progressiva da cartilagem articular que gera um quadro álgico, processo inflamatório nas articulações, instabilidade, rigidez e perda de movimento. Pode afetar qualquer articulação, mas os joelhos, quadris e mãos são as articulações mais estudadas em ensaios clínicos. No total, 10% da população mundial com 60 anos ou mais tem dor ou incapacidade devido a OA (FIDELIX et al., 2014; PAVELKA et al., 2016). Nesses casos as pesquisas mostram que os efeitos benéficos da diacereína estão relacionados com a sua capacidade de diminuir a dor e inflamação, além de diminuir a migração de neutrófilos, inibir citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , inibir a síntese de macromoléculas específicas de cartilagem e de metaloproteinases, impedindo a degradação da cartilagem e minimizando os efeitos da osteoartrite (KONGTHARVONSKUL et al., 2015; PANOVA; JONES, 2015; PAVELKA et al., 2016).

Louthrenoo et al. (2007) realizaram um estudo clínico randomizado e duplo-cego, mostrando a eficácia, segurança e o efeito residual da diacereína no tratamento da osteoartrite de joelho. Os pacientes foram tratados duas vezes ao dia por um período de 16 semanas com diacereína (50 mg) ou com o piroxicam (10 mg). Após o término dos tratamentos os pacientes permaneceram em observação por um período de 8 semanas. A avaliação da dor, rigidez e movimento das articulações, ocorreu por meio de um conjunto de questionários padronizados, além do questionário de qualidade de vida SF-36 e do registro dos efeitos adversos, sendo essas avaliações realizadas mensalmente. Verificaram que a diacereína foi tão eficaz quanto o piroxicam na redução da dor e na melhora da função, além disso, a diacereína apresentou efeito residual. Após o término do tratamento a dor aumentou rapidamente no grupo de piroxicam, enquanto permaneceu estável no grupo diacereína.

Brahmachari et al. (2009), também demonstraram a eficácia e segurança da diacereína na OA de joelho. Foi realizado um ensaio clínico randomizado, controlado por placebo, com 12 semanas de duração, sendo 8 semanas de tratamento e 4 semanas sem tratamento para avaliar o efeito residual do fármaco. Os pacientes foram separados em dois grupos: tanto o grupo tratado com diacereína (50 mg) como o grupo placebo tomaram cápsulas uma vez ao dia, durante os primeiros 10 dias e, em seguida, duas vezes ao dia até o final da 8ª semana de tratamento. As cápsulas placebo eram idênticas ao fármaco ativo em aparência e sabor.

Cada paciente foi acompanhado mensalmente durante as 12 semanas. Sendo avaliado a dor ao movimento por meio de uma escala visual analógica (VAS), foi utilizado diferentes questionários como o índice de osteoartrite WOMAC (Universidades Western Ontario e McMaster), para avaliar rigidez, função física etc., além de registrarem todos os efeitos adversos ao longo do estudo. No final foi demonstrado a eficácia da diacereína no alívio da dor e na melhora da função física. A diacereína reduziu efetivamente a dor, começando a partir de 4 semanas e durou até o final das 12 semanas, e embora os efeitos adversos foram com mais frequência no grupo tratado com diacereína do que no grupo placebo, em sua maioria apresentaram intensidade leve a moderada (BRAHMACHARI; CHATTERJEE; GHOSH, 2009).

Todavia, além de estudos clínicos, pesquisas pré-clínicas têm sido realizadas com o intuito de utilizar a diacereína em outras lesões ou doenças, devido ao seu

mecanismo de ação analgésico/antinociceptivo e anti-inflamatório. O estudo de GADOTTI et al., (2012) avaliou o efeito antinociceptivo da diacereína em camundongos e seu possível mecanismo de ação. Os autores mostraram que a diacereína exerce uma ação antinociceptiva sistêmica, espinal, supra-espinal e local de início rápido e prolongado (até 4 horas) contra a nocicepção visceral induzida pelo ácido acético em camundongos. Além disso, a diacereína foi capaz de inibir a transmissão glutamatérgica através de receptores ionotrópicos e metabotrópicos, bem como a atividade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ).

No trabalho de ZÚÑIGA-ROMERO et al., (2014), foi avaliada a possível interação antinociceptiva entre a diacereína e alguns antiepilépticos (carbamazepina, topiramato e gabapentina) na nocicepção induzida por formalina em ratos *Wistar* fêmeas. A administração local desses fármacos (injeção subcutânea na pata posterior direita), assim como por via oral (gavagem) mostraram efeito antinociceptivo.

Outro estudo como o de Quintão et al. (2005), os autores mostraram que a administração tanto de diacereína como a de gabapentina (utilizada para o tratamento de dor neuropática), produzem inibição da alodinia mecânica induzida por injeção intraplantar de carragenina e pelo Adjuvante de Freud Completo (CFA), sendo que o efeito da diacereína permaneceu durante 48 horas após o tratamento, enquanto que a gabapentina persistiu apenas por 24 horas. Foi verificado também que a administração da diacereína minimiza a dor neuropática induzida por ligadura parcial do nervo isquiático, podendo ser uma alternativa para dor neuropática e inflamatória.

Além destas pesquisas, SILVA et al. (2017) avaliaram os efeitos antinociceptivo, antiedematogênico e condroprotetor da diacereína em modelo de inflamação articular induzida por CFA, e verificaram o envolvimento da metaloproteinase do tipo 9 (MMP-9), do potencial receptor transiente de vanilóide 1 (TRPV1) e das células gliais no mecanismo de ação da diacereína. No geral, este estudo mostrou que a diacereína diminui a nocicepção e edema, além de reduzir o dano articular e a hipersensibilidade associada à inflamação induzida por CFA através da inibição da ativação astrogliar e diminuindo a expressão de TRPV1 e MMP-9 na medula espinal de rato.

Diante de todo esse contexto, o presente estudo utilizou testes comportamentais, bem como análises histológicas e bioquímicas, para verificar a hipótese de que a diacereína (Artrodar®) é capaz de reduzir a dor e a inflamação e

incrementalmente possa apresentar algum potencial para acelerar o processo de regeneração do nervo periférico e assim recuperar a função motora após uma lesão do nervo.

## 2 JUSTIFICATIVA

As lesões nervosas periféricas (LNPs) são consideradas um grande problema relacionado à saúde, representando uma fonte significativa de morbidade na população em geral (FOSTER et al., 2019; HUSSAIN et al., 2020). Exibem uma ampla gama de sinais e sintomas dependendo do tipo da lesão, podendo causar incapacidades físicas, com comprometimento motor e sensorial, dor neuropática, além da depressão que se destaca como a alteração emocional mais presente nesses casos, resultando na redução da qualidade de vida dos pacientes (ALVITES et al., 2018; CHERIF et al., 2020; HUSSAIN et al., 2020; LU; LI; LIU, 2019; ZHANG; AN, 2009).

Adicionalmente alguns dados mostram que aproximadamente 75% dos casos de LNPs acontecem no sexo masculino em idade produtiva, com incidência média de 350.000 casos por ano nos Estados Unidos (MIRANDA; TORRES, 2016; SJEKLOCHA; GATZ, 2021).

Dentre as estratégias terapêuticas as cirurgias para reparo do nervo tornam-se a principal via de tratamento para esses casos. Entretanto, apresentam desvantagens como o tempo de internação longo, o risco de imunossupressão, além de não garantir uma recuperação total do paciente, e ser um tratamento caro (HUSSAIN et al., 2020). De acordo com Sjeklocha & Gatz (2021), o custo médio para a recuperação de LNP's de membros inferiores nos Estados Unidos é de aproximadamente 6 mil dólares em pacientes sem internação e 20.000 a 60.000 dólares em pacientes com internação. Segundo base de dados utilizada por Foster et al. (2019), os fatores mais relevantes para determinar maior custo foram o tempo de internação e local da lesão.

As terapias farmacológicas também são um recurso para os pacientes com LNPs, e incluem antidepressivos tricíclicos (amitriptilina), inibidores da recaptção de serotonina e norepinefrina (Duloxetina), antiepilépticos (Gabapentina) e opioides (tramadol), os quais atuam principalmente na dor neuropática (ATTAL; BOUHASSIRA, 2015). Mas infelizmente, os medicamentos disponíveis também possuem limitações, pois não contribuem com a regeneração nervosa e a recuperação funcional em casos graves (HUSSAIN et al., 2020).

Como comentado anteriormente, os estudos com fármacos que atuam em vias celulares e moleculares envolvida no processo de regeneração nervosa, que podem

auxiliar na recuperação funcional, são incipientes e não apresentam grandes avanços na literatura. Diante disto, existe uma necessidade de mais pesquisas sobre o tema.

Sabendo que o processo de LNP gera sérias consequências para os indivíduos acometidos, prejudicando a qualidade de vida, além de não existir comercialmente medicamentos que acelerem o processo de recuperação após a lesão, justifica-se o presente estudo. A partir disso, esta pesquisa propôs estudar a diacereína, um fármaco que possui propriedades analgésicas e antiinflamatórias (MARTELL-PELLETIER; PELLETIER, 2010), em um modelo experimental de lesão por esmagamento do nervo isquiático.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o tratamento com diacereína no modelo experimental de esmagamento do nervo isquiático em camundongos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do tratamento com diacereína na hiperalgesia mecânica e térmica (frio) em animais com lesão do nervo isquiático.

Avaliar a função motora, comportamento de desesperança, anedonia e bem-estar dos animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático, tratados ou não com diacereína.

Verificar o potencial da diacereína no processo de regeneração, por meio da análise morfológica e morfométrica do nervo isquiático no 15º dia após a lesão.

Analisar a concentração da citocina pró-inflamatória (IL-1 $\beta$ ) e do fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF), no nervo isquiático de animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático e tratados com diacereína.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

O presente estudo caracteriza-se como uma pesquisa pré-clínica, quantitativa e randomizada. Para isso foi utilizado um total de 196 camundongos Suiços, machos, com idade média de 8 semanas e pesando entre 25-40g, obtidos do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), os quais foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI). O biotério setorial LANDI é equipado com 1 Estante Ventilada (ALESCO®) e com 3 sistema de Estante de Mini isoladores (ALESCO®), a qual fornece melhor qualidade de vida e proteção aos animais, uma vez que o sistema de circulação do ar vinculado a este tipo de sistema injeta o ar diretamente no mini-isolador, em fluxo contínuo e de baixa velocidade, garantindo uma troca de ar ideal e bem-estar dos animais.

Desta maneira, os animais permaneceram em caixas padrão de polipropileno (30x20x13cm), sendo 4 camundongos por caixa, essas caixas foram mantidas num mini-isolador (Alesco®), permanecendo em ambiente com temperatura de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro, recebendo água e ração *ad libitum*. A ração fornecida era industrial, proveniente do biotério central da UFSC. A água para os animais era filtrada. E a exaustão de ar/ventilação foi por meio de ar-condicionado. Todas as caixas foram limpas e trocadas 3 vezes por semana, colocando maravalha limpa fornecida pelo biotério central. A cada troca de caixa foi avaliada a necessidade de repor a ração industrial e sempre houve o cuidado de manter o local limpo e evitar contaminação.

Antes da realização dos testes comportamentais os animais foram mantidos na sala de experimentos para aclimatação por pelo menos 1 hora. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética de uso de animais da UFSC (CEUA/UFSC) sob o número: 3042250219 e os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983).

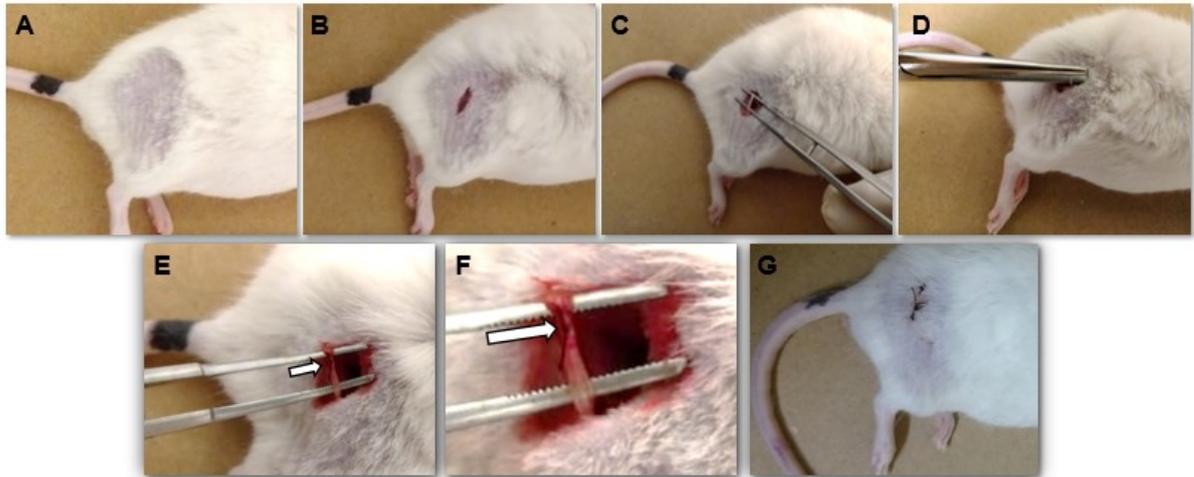
## 4.2 MODELO DE LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO

Prévio ao procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático, os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg - anestésico dissociativo) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg - anestésico que promove sedação, analgesia e relaxamento muscular) por via intraperitoneal, essa anestesia pode produzir uma sedação em torno de 30 minutos, tempo suficiente para realizar o procedimento cirúrgico (DAMY et al., 2010). Após a aplicação dos anestésicos, foi realizada a verificação do estado de consciência do animal (observado pela ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), em seguida, os animais foram posicionados para realizar a tricotomia no local do procedimento cirúrgico.

Posteriormente, foi realizada uma incisão curvilínea na coxa direita do animal, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminando próximo à fossa poplítea, ao nível da inserção dos músculos isquiotibiais, expondo o nervo isquiático por meio da divulsão do músculo bíceps femoral, e com uso da pinça hemostática não serrilhada foi realizado o esmagamento do nervo isquiático, por um período de 30 segundos. A pressão de pinçamento foi padronizada para todos os animais, utilizando-se como referência o primeiro dente da cremalheira, sendo todos os pinçamentos realizados pelo mesmo indivíduo (BRIDGE et al., 1994).

Para a etapa da histologia foi realizada uma sutura epineural com fio estéril não absorvível (7.0) para marcar o local do esmagamento (para posteriores análises morfológicas e morfométricas). Por fim, foi realizada a sutura externa com fio absorvível (Ethicon, 4-0) e realizada a assepsia no local com anti-séptico (Povidine®), assim, os animais foram alojados nas mesmas condições pré-cirúrgicas, e separados de acordo com o seu grupo experimental. Foi utilizado soro fisiológico (0,9%) aquecido (37°C), administrado por via subcutânea (dose de 3% do peso corporal do animal) para auxiliar na recuperação do animal (CONCEA, 2018). Além disso, os animais também foram monitorados após a cirurgia por aproximadamente duas horas. Os animais dos grupos falso-operados foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, mas o nervo isquiático não foi lesionado (Figura 5).

Figura 5 – Esmagamento do nervo isquiático direito



Legenda: Etapas do procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático. **A** – Após a anestesia o camundongo foi submetido a tricotomia na região da cirurgia. **B** – Incisão na coxa posterior direita. **C** – Após a divulsão muscular foi encontrado o nervo isquiático direito. **D** – Realizado o esmagamento do nervo com uma pinça hemostática durante 30 segundos. **E** – Seta branca mostra a sutura/ponto epineural realizada após a lesão do nervo. **F** – Sutura epineural em maior aumento. **G** – Sutura externa da pele. Fonte: da autora.

#### 4.3 TRATAMENTO COM DIACEREÍNA

Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais receberam o tratamento com diacereína (TRB Pharma, São Paulo, Brasil) ou veículo por via intragástrica (gavagem). Sendo o veículo 6% de tween 80 e 94% de salina (mesmo utilizado para preparar a diacereína). Os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia, de manhã ( $\cong$  8:00) e a tarde ( $\cong$  17:00).

Dependendo do grupo experimental os animais receberam 10 ml/kg de veículo ou foram tratados com diferentes doses de diacereína: 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg (abaixo a descrição de cada grupo experimental).

#### 4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os camundongos foram separados aleatoriamente em seis grupos:

- FO (Falso operado + veículo) – animais submetidos a gavagem com solução salina e 6% tween 80.

- FO + DIA 30 mg/kg (Falso operado + diacereína 30 mg/kg) – animais submetidos a gavagem com diacereína na dose de 30 mg/kg.
- LNI (Lesão do nervo isquiático + veículo) – animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático e gavagem com solução salina e 6 % tween 80.
- LNI + DIA 3 mg/kg (Lesão + diacereína 3 mg/kg) – animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático e tratados com diacereína na dose de 3 mg/kg.
- LNI + DIA 10 mg/kg (Lesão + diacereína 10 mg/kg) – animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático e tratados com diacereína na dose de 10 mg/kg.
- LNI + DIA 30mg/kg (Lesão + diacereína 30 mg/kg) – animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático e tratados com diacereína na dose de 30 mg/kg.

#### 4.5 ETAPAS DA PESQUISA

Esta pesquisa foi separada em 3 experimentos (etapas), em todas as etapas os animais foram submetidos ao protocolo de esmagamento do nervo isquiático e ao protocolo de tratamento. Além disso, os testes comportamentais foram repetidos ao longo da pesquisa. Essa repetição dos experimentos teve o intuito de demonstrar a reprodutibilidade do estudo e de obter um n amostral satisfatório para análise estatística.

No experimento 1, subdividido em A e B, foram realizados os testes comportamentais. No experimento 2 o intuito foi coletar o nervo isquiático para análise histológica e no experimento 3 a finalidade foi fazer análises bioquímicas no nervo isquiático. Abaixo uma breve descrição de cada etapa (Tabela 1).

**Experimento 1:** Todo o experimento teve duração de 28 dias. Nesta fase os animais foram submetidos a gavagem com diacereína ou veículo, sendo tratados por 21 dias consecutivos. Este experimento foi subdividido em A e B (Figura 6).

• **Experimento 1A:** Foram realizadas as avaliações da hiperalgesia mecânica (Von Frey), hiperalgesia térmica (teste acetona – frio), comportamento de guarda da pata (dor-espontânea), índice funcional dinâmico (IFD) e escada horizontal

(EH). Com o objetivo de verificar a reprodutibilidade dos resultados, esses testes comportamentais foram repetidos em duas etapas, em cada etapa foi utilizado 24 animais (sendo 4 animais por grupo), ou seja, utilizou-se 48 animais no total, separados em seis grupos experimentais (conforme descrito no item 4.5 – grupos experimentais).

- **Experimento 1B:** Na primeira etapa do estudo, ainda foram realizadas as avaliações da atividade locomotora (campo aberto), do comportamento tipo-depressivo (suspensão pela cauda, nado forçado e preferência por sacarose) e o do bem-estar animal (teste do ninho). Esses testes comportamentais também foram repetidos em duas etapas, e em cada etapa foi utilizada 18 animais. No total foram utilizados 36 camundongos separados em quatro grupos: FO; FO+DIA 30 mg/kg; LNI e LNI+DIA 30 mg/kg.

**Experimento 2:** Esta fase teve duração de 15 dias, e os animais foram tratados por 14 dias. No final do experimento (15º dia) foi coletado o nervo isquiático direito para análise histológica. Foram utilizados 32 animais separados nos seguintes grupos: FO; FO+DIA 30 mg/kg; LNI e LNI+DIA 30 mg/kg.

**Experimento 3:** Esta fase teve duração de 7 dias e os animais receberam tratamento por 6 dias. Este experimento foi repetido em duas etapas (A e B):

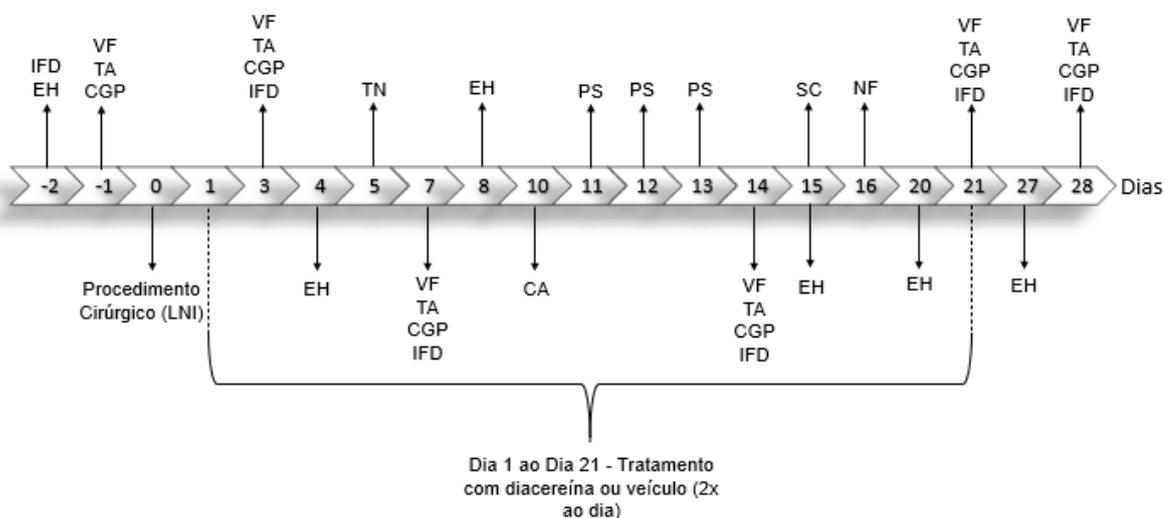
- **Experimento 3A e 3B:** Foi coletado o nervo isquiático no 7º dia após o procedimento cirúrgico, para analisar as concentrações da IL-1 $\beta$  e do BDNF por meio de Kits de ELISA. Foram utilizados 40 animais em cada etapa (total 80) separados nos seguintes grupos: FO; FO+DIA 30 mg/kg; LNI e LNI+DIA 30 mg/kg.

Tabela 1 – Delineamento das etapas com número de animais. O experimento ocorreu em três momentos diferentes: durante 28, 15 e 7 dias.

Duração do experimento	Descrição dos experimentos (Etapas)	
	Experimento A	Experimento B
<b>Experimento 1 28 dias</b>	Avaliação comportamental (hiperalgesia mecânica/térmica) e função motora) – Experimento repetido duas vezes. Número total de animais = 48	Avaliação comportamental (emocionalidade) – Experimento repetido duas vezes. Número total de animais = 36
<b>Experimento 2 15 dias</b>	Coletado o nervo isquiático direito no 15º dia após LNI para histologia N = 32	
<b>Experimento 3 7 dias</b>	Coletado o nervo isquiático direito no 7º dia após LNI para análise de IL-1 $\beta$ e de BDNF n= 40	Coletado o nervo isquiático direito no 7º dia após LNI para análise de IL-1 $\beta$ e de BDNF n= 40

Figura 6 – Linha do tempo dos testes comportamentais.

### Experimento 1



Legenda: Mostra os testes comportamentais e os dias em que os animais foram avaliados. VF: Von frey; TA: Teste da acetona; CGP: Comportamento de guarda da pata; CA: Campos aberto; IFD: Índice funcional dinâmico; EH: Escada horizontal; SC: Suspensão pela cauda; NF: Nado forçado; PS: Preferência por sacarose; TN: Teste do ninho; LNI: Lesão do nervo isquiático. Fonte: da autora.

## 4.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

Nesta sessão será detalhado os testes comportamentais, sendo eles a hiperalgesia mecânica e térmica, comportamento de guarda da pata, campo aberto, teste de função motora (índice funcional e a escada horizontal), e testes de emocionalidade como: desesperança (teste de suspensão pela cauda e nado forçado) anedonia (teste de preferência por sacarose) e bem-estar do animal (teste do ninho).

### 4.6.1 Hiperalgesia mecânica: Teste do filamento de Von Frey

A hiperalgesia é uns dos sintomas presentes após uma LNP, para avalia-la nos animais foi utilizado o filamento de Von Frey manual (VFH, Stoelting, Chicago, USA) pelo método de frequência (KIM et al., 2016; UHELSKI; KHASABOVA; SIMONE, 2015). Primeiramente os animais foram colocados individualmente, durante 30 minutos, para ambientar em caixas de acrílico transparentes (9x9x8 cm) sem fundo e cobertos com tampa, posicionada sobre uma plataforma elevada feita em malha de arame de 6mm, para permitir o acesso do filamento de von Frey à superfície ventral das patas posteriores na região do calcâneo.

Após o período de ambientação, o filamento (0,4 g) foi aplicado dez vezes na pata posterior direita de cada camundongo, e entre cada aplicação foi feito um intervalo de 5 segundos. Para esse método de avaliação foi respeitado alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total, sendo os animais avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela e a resposta de retirada foi considerada quando o animal retirou totalmente a pata da tela de apoio. Por fim, o número total de respostas de retirada da pata, frente ao estímulo do filamento, foi contabilizado e expresso em porcentagem. (Figura 7).

Esse teste foi realizado na parte da manhã e teve início 1 hora após os animais serem tratados com diacereína ou veículo.

Essa avaliação foi realizada antes do procedimento cirúrgico (basal), no 3º, 7º, 14º, 21º e no 28º dia após o esmagamento do nervo.

Figura 7 – Avaliação da hiperalgesia mecânica com o filamento de von Frey (0,4 g)

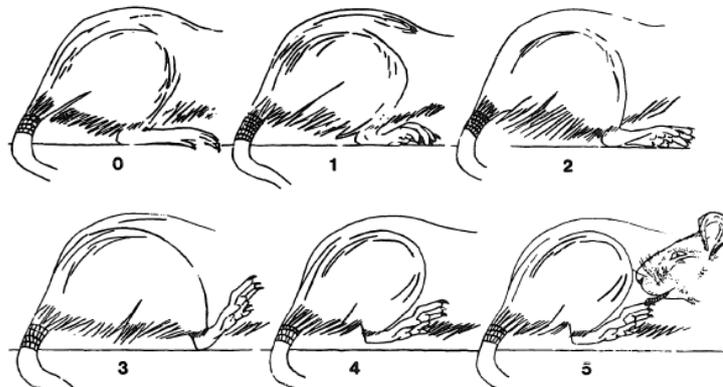


Legenda: Camundongo dentro da caixa de acrílico sob a plataforma elevada feita de malha de arame e o filamento de von Frey (0,4 g) aplicado na região plantar da pata posterior direita do animal. Fonte: da autora.

#### 4.6.2 Comportamento de guarda da pata (dor espontânea)

Durante o tempo de ambientação do teste do von Frey, cada camundongo foi avaliado com o objetivo de quantificar o comportamento de guarda da pata, considerado um indicador de dor espontânea. Nesta avaliação foi observado a pata posterior direita do animal e por meio de uma escala subjetiva foi dada uma pontuação de 0 a 5, sendo: 0 = normal, a pata repousa normalmente no chão; 1 = a pata repousa levemente no chão e os dedos estão flexionados/encurvados; 2 = ocorre eversão do pé; 3 = ocorre rolamento de peso parcial (somente o calcanhar está posicionado no chão); 4 = não rolamento e proteção sem peso (pata permanece elevada); 5 = evita qualquer contato com o membro e lambe a pata operada (Figura 8) (ATTAL et al., 1990; SILVA et al., 2017). Essa pontuação foi analisada antes e nos mesmos dias que o teste da hiperalgesia mecânica (Basal, 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia).

Figura 8 – Comportamento de guarda da pata



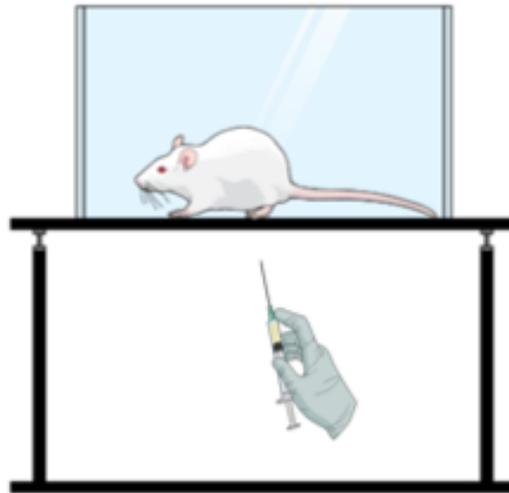
Legenda: Ilustração demonstrando as diferentes pontuações do comportamento de guarda da pata em um roedor. Fonte: (ATTAL et al., 1990).

#### 4.6.3 Hiperalgesia térmica ao frio – Teste da acetona

Após a avaliação da hiperalgesia mecânica os animais permaneceram na plataforma, e depois de 15 minutos, foi iniciado o teste de hiperalgesia térmica. Nesta avaliação, o estímulo ao frio foi verificado utilizando o teste da acetona. Para isso, foi aplicado 100 µl de acetona à superfície plantar da pata posterior direita de cada animal. Os camundongos foram observados durante 20 segundos após cada aplicação de acetona. Foi considerado o tempo gasto para lambe, morder e sacudir a pata avaliada, dentro de uma pontuação de 0 a 3, sendo: **0** – nenhuma resposta; **1** – rápida retirada da pata ou agitação em um tempo menor que um segundo; **2** – repetida agitação ou elevação da pata em um tempo menor que três segundos; e **3** – comportamentos anteriores com um tempo maior que três segundos (Figura 9) (FLATTERS; BENNETT, 2004).

O teste da acetona foi realizado após a avaliação da hiperalgesia mecânica e nos mesmos dias (Basal, 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dia após a lesão).

Figura 9 – Hiperalgisia térmica (teste da acetona)

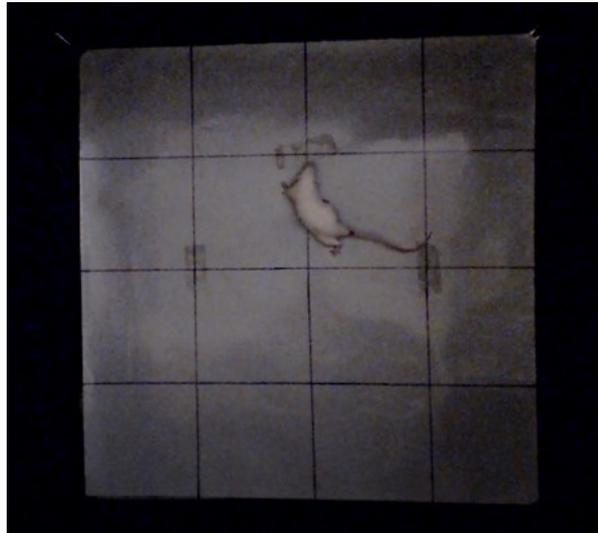


Legenda: Ilustração representando o teste da acetona. Foi utilizado uma seringa para esguichar 100  $\mu$ l de acetona na pata posterior direita de cada animal. Fonte: Elaborada pela autora, usando o programa *Mind the Graph*.

#### 4.6.4 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado com o intuito de verificar se a lesão do nervo isquiático e/ou o tratamento poderiam interferir na atividade locomotora do animal. Para isso os animais foram submetidos ao teste no 10º dia após ao esmagamento do nervo isquiático. O aparato consiste em uma caixa com dimensões 40x60x50 cm. O fundo da caixa é dividido em 12 quadrados iguais e foi contabilizado o número de total cruzamentos que o camundongo executou com todas as quatro patas, tanto no centro como nas laterais da caixa. Esse teste foi realizado na parte da manhã e teve início 1 hora após os animais serem tratados com diacereína ou veículo. Essa avaliação teve duração de 5 minutos e entre cada animal a caixa foi limpa com álcool 70% (Figura 10) (NUCCI et al., 2012).

Figura 10 – Teste do Campo aberto



Legenda: Teste do campo aberto para avaliar a atividade locomotora do camundongo. Fonte: da autora.

#### 4.6.5 Índice funcional do nervo isquiático

Para avaliar os déficits motores que são evidentes após a lesão nervosa, os animais caminharam por uma pista de vidro (42 x 8,5 x 9cm), sendo que abaixo do vidro havia uma câmera Web Cam (Logitech®) acoplada a um computador, pela qual foram obtidas imagens da marcha do animal. O método é baseado na medida de parâmetros pré-estabelecidos nas impressões da pata posterior dos animais, sendo mensurado: o comprimento da pata (PL ou *print lenght*) que é a distância entre os dois pontos mais extremos da pegada no sentido longitudinal (entre calcanhar e a ponta do 3º dedo); e o espalhar total dos dedos (TS ou *total spread*) que é a distância entre os dois pontos mais extremos da pegada, no sentido transversal (entre o 1º e 5º dedo). Essas medidas foram realizadas tanto do lado experimental (E, ipsilateral da lesão) quanto do lado normal (N, contralateral da lesão) (Figura 11) (BAPTISTA et al., 2007; MEDINACELI; FREED; WYATT, 1982).

Tais medidas foram realizadas pelo programa Image-Pro Plus 6.0 (MediaCybernetics, Inc.® - Estados Unidos da América) e analisadas no programa Microsoft Office Excel 2016 com a seguinte fórmula (1) (BAPTISTA et al., 2007; INSERRA; BLOCH; TERRIS, 1998):

Índice funcional dinâmico do nervo isquiático (IFD):

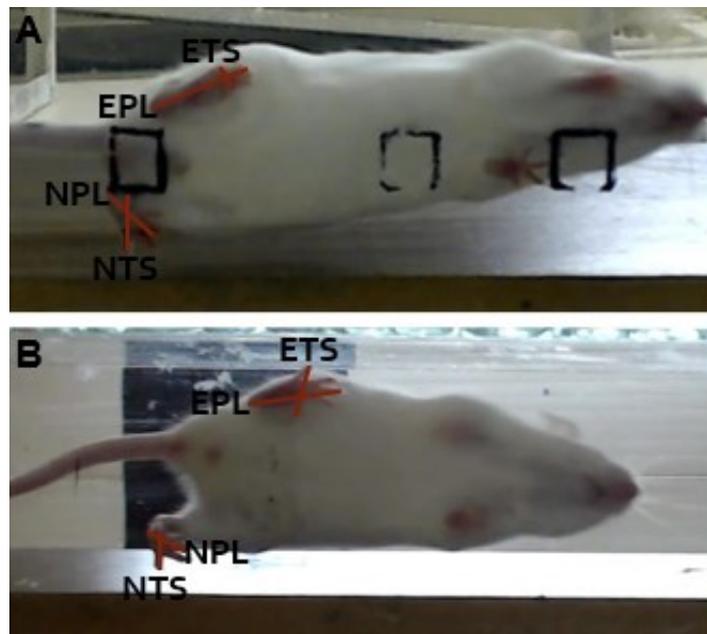
$$IFD = 118,9 \cdot \frac{ETS-NTS}{NTS} - 51,2 \cdot \frac{EPL-NPL}{NPL} - 7,5 \quad (1)$$

(ETS: distância total dos dedos do lado experimental; NTS: distância total dos dedos do lado normal; EPL: comprimento da pata do lado experimental; NPL: comprimento da pata do lado normal).

Os resultados foram expressos em percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde a função normal e -100 (menos cem) à disfunção total (BAPTISTA et al., 2007; INSERRA; BLOCH; TERRIS, 1998).

Os animais foram treinados no aparato uma vez por dia por uma semana, antes do esmagamento do nervo isquiático, para se familiarizarem ao aparato e ao procedimento. Esta avaliação foi realizada antes da cirurgia (pré - lesão), no 3º, 7º, 14º, 21º, 28º dia após procedimento cirúrgico.

Figura 11 – Índice funcional do nervo isquiático



Legenda: Mensurações realizadas nas patas posteriores dos camundongos. ETS: distância total dos dedos do lado experimental; NTS: distância total dos dedos do lado normal; EPL: comprimento da pata do lado experimental; NPL: comprimento da pata do lado normal. **A** – Camundongo com lesão no nervo isquiático. **B** – Camundongo falso-operado. Fonte: da autora.

#### 4.6.6 Teste da escada horizontal

A escada horizontal é um teste motor e de coordenação, esta avaliação permite medidas quantitativas da função motora do animal e tem a intenção de avaliar os déficits funcionais que ocorrem após a lesão do nervo (METZ; WHISHAW, 2009).

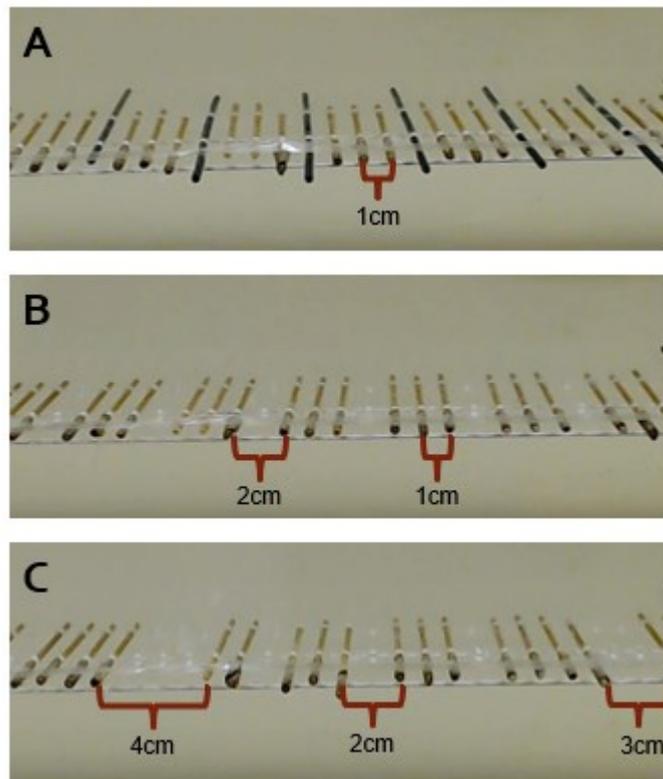
A escada horizontal é constituída por uma pista de 100 cm de comprimento e 10 cm de largura, com duas paredes laterais transparentes de 100 cm de comprimento e 20 cm de altura. A escada foi posicionada em cima da bancada e elevada a 15 cm. O piso da pista de caminhada é formado por degraus (bastões removíveis) que foram posicionados em torno de 1 a 4 cm de distância entre eles, sendo modificado a distância dos degraus a cada sessão de treinamento para impedir que os animais aprendessem a tarefa. Uma câmara de vídeo Web Cam (Logitech®) foi posicionada na parte lateral da escada para gravar as imagens obtidas da caminhada do animal.

Por meio deste teste foi avaliado os passos do animal ao longo da escada horizontal utilizando uma pontuação de 0 a 6. Cada animal realizou três caminhadas por sessão (em cada caminhada foi estabelecido um padrão diferente) e foi obtida uma média da pontuação (Figura 12).

Nesta pesquisa essa pontuação foi aplicada no membro posterior direito, sendo: 0 – Erro total (a pata não pisa no bastão e erra o passo); 1 – Deslizamento profundo (a pata pisa no bastão, mas escorrega e desliza entre os bastões); 2 – Um ligeiro deslize (a pata pisa no bastão, escorrega levemente, mas não cai entre os bastões e não interrompe o ciclo da marcha); 3 – Substituição (a pata pisa no bastão, mas antes de realizar a descarga de peso sobre o membro, rapidamente levanta a mesma pata e coloca em outro degrau; 4 - Correção (o membro avaliado corrige o passo); 5 – Pisada/colocação parcial (a pata pisa no bastão com o calcanhar ou com os dedos); 6 - Pisada/colocação correta (a pata foi colocada no bastão com suporte total de peso) (ALANT et al., 2013; METZ; WHISHAW, 2009; RIBEIRO et al., 2017).

Primeiramente os animais foram treinados a caminhar ao longo da escada horizontal antes do procedimento cirúrgico por 3 dias. Esta avaliação ocorreu antes da cirurgia de esmagamento do nervo isquiático e no 4º, 8º, 15º, 20º e 27º dia após a cirurgia.

Figura 12 - Teste da escada horizontal



Legenda: Exemplo de diferentes padrões utilizados no teste da escada horizontal. **A** – Mostra a distância de 1cm entre cada bastão. **B** e **C** – Mostra dois diferentes padrões com distância de 1cm a 4cm entre os bastões. Fonte: da autora.

#### 4.6.7 Teste de suspensão pela cauda

Para avaliar o comportamento de imobilidade dos animais que pode ser associado a desesperança, que é um sintoma presente em humanos com depressão, foi realizado o teste de suspensão pela cauda de acordo com Steru et al. (1985). No 15º dia após o esmagamento do nervo isquiático, os animais foram mantidos em uma sala sem estímulos sonoros. Os camundongos foram visualmente isolados por um compartimento, e cada camundongo foi suspenso e fixado a uma mesa a 50 cm do chão por meio de uma fita adesiva colocada na cauda (Figura 13). Este teste teve duração de 5 minutos, o qual foi filmado com uma câmera webcam (Logitech®) posicionada na frente do animal. As imagens foram gravadas e posteriormente foi contabilizado o tempo de imobilidade. É caracterizado um comportamento tipo-depressivo, quando o animal permanece grande parte do tempo imóvel. Esse teste foi

realizado na parte da manhã e teve início 1 hora após os animais serem tratados com diacereína ou veículo.

Figura 13 – Teste de suspensão pela cauda



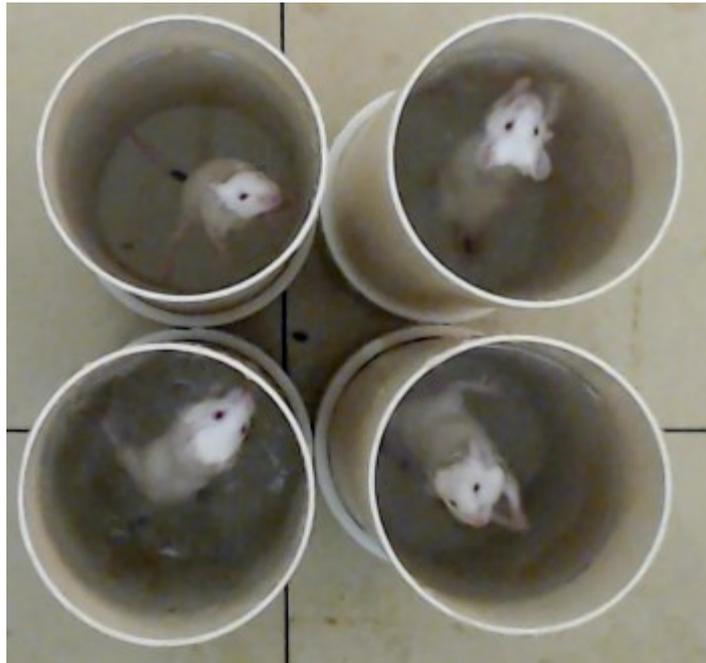
Legenda: Exemplo de dois camundongos no teste de suspensão pela cauda. Foi contabilizado o tempo de imobilidade de cada camundongo. Fonte: da autora.

#### 4.6.8 Teste de natação forçada - FST

Os camundongos colocados dentro de um tanque com água sem condições de escapar apresentam comportamento de imobilidade que pode ser associado a desesperança, a exemplo do teste de suspensão pela cauda, que é um sintoma presente em humanos com depressão. Para a realização do teste de natação forçada, os animais foram colocados individualmente em um recipiente cilíndrico (diâmetro 20 cm, altura 30 cm), contendo 15 cm de água a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Esse teste teve duração de 6 minutos, e entre um animal e outro, a água do recipiente cilíndrico foi trocada por água limpa. Esse teste foi filmado com uma câmera webcam (Logitech®), conectada a um computador, a qual foi posicionada 30 cm acima do recipiente com água. As imagens foram gravadas e posteriormente avaliado o tempo de imobilidade de cada animal. Cada camundongo foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, sendo que foi aceito no teste os movimentos necessários para manter a cabeça acima da água (Figura 14). Uma diminuição da duração da imobilidade foi considerada uma atividade do tipo antidepressiva (CAN et al., 2011). Após este período, os animais

foram retirados da água, gentilmente secados com papel absorvente e retornaram às suas respectivas caixas. Este teste teve início 1 hora após os animais serem tratados com diacereína ou veículo e foi realizado no 16º dia após procedimento cirúrgico.

Figura 14 - Teste do nado forçado



Legenda: Figura representando o teste do nado forçado em camundongos. Fonte: da autora.

#### **4.6.9 Teste preferência por sacarose**

Para avaliar o comportamento de anedonia em camundongos, um sintoma presente e relevante da depressão em humanos, foi utilizado o teste de preferência por sacarose (KREMER et al., 2020; WILLNER et al., 1987). Este teste comportamental consiste em um protocolo de livre escolha entre duas soluções, (1) água e (2) sacarose (1%) que é doce e mais palatável que a água. Para este teste os animais já estavam separados em seus respectivos grupos e para evitar o estresse do isolamento, os animais não foram separados.

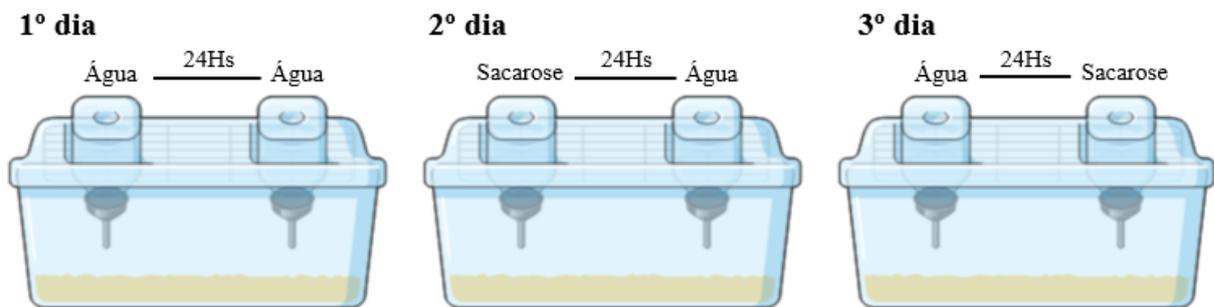
No 10º dia após lesão do nervo isquiático os camundongos foram habituados a beber água em duas garrafas por 24h (1º dia do teste). Após habituação inicial, uma das garrafas de água foi substituída por uma solução de sacarose (1%) que permaneceu na caixa do animal por 24h (2º dia do teste). Depois desse período foi verificado a consumo (volume) de água e sacarose ingerido pelo animal. No 3º dia de

teste a posição das garrafas foi invertida para evitar o viés da preferência do animal por um lado específico, no final (após 24h) foi verificado novamente o consumo de água e sacarose dos animais (Figura 15).

Para estimar a preferência de sacarose por animal, o volume total consumido foi dividido pelo número total de animais em cada caixa (MANOUZE et al., 2019). Por fim, a preferência por sacarose da caixa foi calculada como uma porcentagem do volume de sacarose ingerido dividido pelo volume total de líquidos ingeridos (sacarose + água), de acordo com a seguinte fórmula (2):

$$\text{Preferência por sacarose (\%)} = 100 \cdot \frac{V_{\text{sacarose}}}{V_{\text{sacarose}} + V_{\text{água}}} \quad (2)$$

Figura 15 - Teste de preferência por sacarose



Legenda: Figura representando o teste de preferência por sacarose. 1º dia: Os camundongos foram ambientados com 2 garrafas de água. 2º dia: Uma garrafa de água foi trocada por uma de sacarose e após 24hs verifica o consumo de sacarose e água. 3º dia: A posição das garrafas foi invertida e após 24hs verifica o consumo de sacarose e água. Fonte: Elaborada pela autora, usando o programa *Mind the Graph*.

#### 4.6.10 Teste do Ninho

A construção do ninho é normal em todo o reino animal. No caso de pequenos roedores como os camundongos, o ninho é construído tanto por machos como por fêmeas e serve não somente para a reprodução, mas também para manter o corpo aquecido, podendo ser conveniente para abrigar roedores de seus predadores. É considerado um hábito natural e pode ser um indicador de bem-estar animal (KREMER et al., 2020).

Para avaliar a construção do ninho, aproximadamente 1 hora antes do ciclo escuro ( $\cong$  18 horas da tarde), os animais foram transferidos para gaiolas individuais e

receberam uma porção de algodão para construir seus ninhos. Cada porção de algodão pesava aproximadamente 3g. Após 12h os ninhos foram avaliados em uma pontuação entre 1 a 5, em que: 1) algodão >90% intacto, 2) Algodão está 50 – 90% intacto, 3) <50% do algodão rasgado, mas não formou um ninho, 4) >90% do algodão rasgado, ninho identificado, mas plano e 5) ninho formado, com muros mais altos que o corpo do animal (DEACON, 2006). Uma pontuação baixa na construção do ninho pode estar associada a desesperança ou diminuição da motivação, sintomas característicos em humanos com depressão (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019). Este teste ocorreu no 5º dia após a lesão do nervo isquiático.

#### 4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Em outra etapa do estudo (experimento II), no 15º dia do procedimento cirúrgico, os animais foram eutanasiados por overdose de CO<sub>2</sub> e foi coletado o nervo isquiático direito (região distal à lesão), o qual foi fixado por 24 horas em paraformoldeído a 4% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) – pH 7,2.

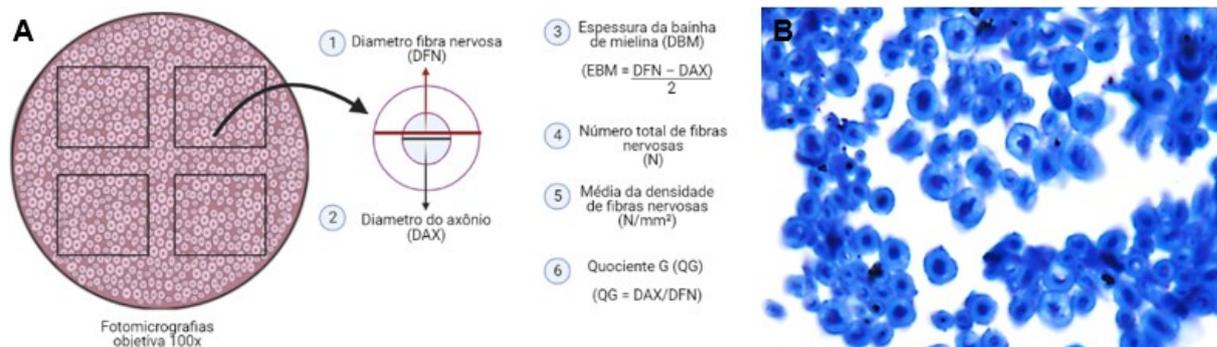
Posteriormente o nervo foi desidratado em álcool, diafanizado em xilol, infiltrado e embocado em parafina e seccionado transversalmente em 5 µm de espessura no micrótomo (Rotativo Leica RM2255). Além disso, foi realizado o procedimento para confecção de lâminas histológicas, com coloração em hematoxilina e eosina (HE) (utilizada para análise morfológica) e azul de toluidina (utilizada para análise morfométrica). Este procedimento foi realizado no processador de amostras Leica TP1020, no embocador de amostras Leica EG1150H e no micrótomo Rotativo Leica RM2255 do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/UFSC).

As lâminas histológicas confeccionadas foram fotomicrografadas no aparelho Olympus BX41 (LAMEB/UFSC). Nesta etapa o nervo foi fotomicrografado, utilizando a objetiva de 100x, em quatro campos. Posteriormente foi estimado o número total de fibras nervosas (N), a média da densidade das fibras nervosas (N/mm<sup>2</sup>), o diâmetro da fibra nervosa (DFN), o diâmetro do axônio (DAX), a espessura da bainha de mielina (EBM = (DFN – DAX) / 2), e o quociente G (QG = DAX/DFN). Esses parâmetros foram quantificados em uma área de 0,01068 mm<sup>2</sup>/campo, por meio do programa Image Pro-Plus 6.0 e utilizando o zoom de 50% do próprio programa (Figura 16).

Para o número total de fibras nervosas foram contabilizados todos os axônios de cada um dos campos e somados. No caso da densidade das fibras nervosas, o número de axônios foi dividido pela área do campo. Para o cálculo dos DFN, DAX e EBM foi selecionado de modo aleatório aproximadamente 25 fibras nervosas em cada campo.

Com relação à análise morfológica, foram observadas e descritas as características visualizadas no laminário, quanto às seguintes estruturas: epineuro, perineuro e endoneuro, fibra nervosa, infiltrado inflamatório e células de Schwann (ANTUNES et al., 2019).

Figura 16 – Análise morfométrica do nervo isquiático



Legenda: **A**: Exemplo esquemático da análise morfométrica. O nervo isquiático foi fotomicrografado em quatro campos, utilizando a objetiva de 100x, posteriormente foi mensurado o número e a densidade das fibras nervosas, o DFN, o DAX, a EBM e o QG. **B**: Exemplo de fotomicrografia (objetiva de 100x com zoom de 50% do programa Image Pro-Plus 6.0) do nervo isquiático de camundongos Swiss no 15º dia após a lesão, com coloração em azul de toluidina. Fonte: **A**: elaborada pela autora, usando o programa *Biorender*; **B**: da autora.

#### 4.8 QUANTIFICAÇÃO DE IL-1 $\beta$ E DO FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO ENCÉFALO

Em outro conjunto de experimentos (Experimento III), no 7º após a lesão, os animais foram eutanasiados e foi dissecado o nervo isquiático direito. As amostras foram imediatamente congeladas e estocadas a -80°C. Para a homogeneização as amostras foram colocadas em tampão fosfato (PBS), que contém inibidores de proteases e detergentes (cloreto de benzametônio (0,1 mM); cloreto de sódio (NaCl 0,4 M); ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) (10 mM); Tween® 20 (0,05%); albumina sérica bovina (BSA) (0,5%); aprotinina e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF)), e

posteriormente foram centrifugadas a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado e estocado novamente a -80°C. A concentração proteica foi determinada usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas de 100 µL foram utilizadas para verificar os níveis da IL1-β (88-7013) e do BDNF (DY248) por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), utilizando, respectivamente, os kits da Invitrogen e R&D, seguindo o protocolo do fabricante. A absorbância para todas as proteínas estudadas foi mensurada utilizando um leitor de placas de 450 e 550 nm (Multileitora infinite m200 TECAN – LAMEB/UFSC) e os valores estão expressos como pg/mg de proteína.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Nos testes comportamentais, para os dados paramétricos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias com pós-teste de Bonferroni, e para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Na análise morfométrica do nervo foi realizado ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman Keuls, sendo o mesmo teste utilizado para a análise da citocina e do fator neurotrófico. Os resultados expressos como média ± erro padrão da média. Foi empregado um nível de significância para  $\alpha = 0,05$ . Todas as análises e gráficos foram realizados no programa *GraphPad Prism 8.0*.

## 5 RESULTADOS

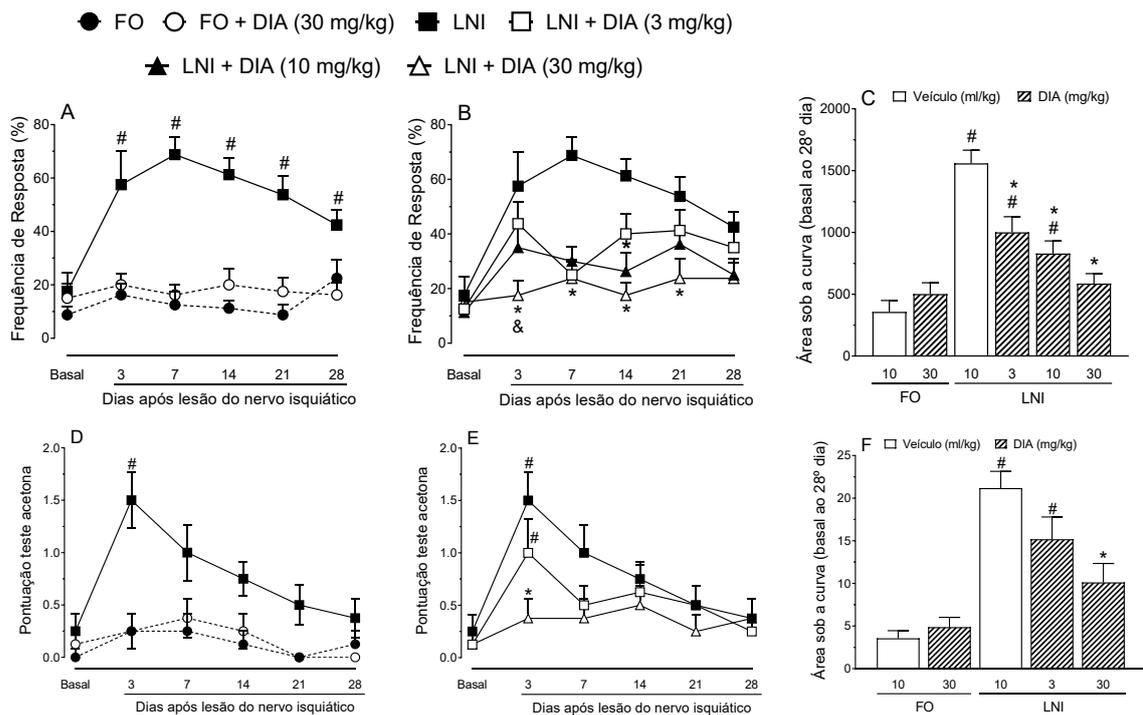
### 5.1 TRATAMENTO COM DIACEREÍNA REDUZ A HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS OU NÃO A LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO.

A lesão por esmagamento do nervo isquiático induziu hiperalgesia nos animais do grupo operado (LNI), que foi evidente do 3º até o 28º dia após a lesão [ $F_{(5, 35)} = 8,581$ ;  $p < 0,0001$ ], tendo diferença significativa com os grupos falso-operados [ $F_{(5, 35)} = 15,67$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. 17A). Além disto, é possível observar que a resposta ao filamento de von Frey dos animais do grupo FO foi semelhante ao do grupo FO + DIA 30 mg/kg (Fig. 17A). Todavia, os animais lesionados e tratados com diacereína, independente da dose, apresentaram evidente redução da hiperalgesia no decorrer do tempo de tratamento e observação, sendo significativa do 3º ao 21º dia para a dose de 30 mg/kg [ $F_{(5, 35)} = 8,581$ ;  $p < 0,0001$ ], apresentando também diferença significativa em relação aos animais do grupo LNI [ $F_{(5, 35)} = 15,67$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. 17B). Adicionalmente, os dados analisados da área sob a curva e apresentados na figura 17C claramente mostram diferença significativa entre os grupos [ $F_{(5, 42)} = 18,73$ ;  $p < 0,0001$ ], sendo que o efeito da diacereína foi dependente da dose, onde a dose de 3, 10 e 30 mg/kg foram significativamente diferente do grupo lesionado (LNI) ( $p < 0,0047$ ). Com base nestes resultados, fica claro que o tratamento com diacereína foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica observada nos animais submetido a lesão do nervo isquiático, sendo evidente que a diacereína na dose de 30 mg/kg apresentou maior eficácia com redução de  $86 \pm 7\%$  da hiperalgesia (Fig. 16C). Diante disto, para a continuidade do estudo e realização dos experimentos adicionais foi escolhida a dose de 3 mg/kg (menor eficácia,  $49 \pm 11\%$ ) e a dose de 30 mg/kg (maior eficácia,  $86 \pm 7\%$ ).

A figura 17D, mostra que a lesão por esmagamento do nervo isquiático também induziu hiperalgesia ao frio nos animais do grupo operado (LNI), que foi significativo no 3º dia [ $F_{(5, 35)} = 5,797$ ;  $p = 0,0005$ ] e permaneceu elevado, porém não significativo até o 21º dia após a lesão, comparado com os animais dos grupos falso-operados [ $F_{(4, 28)} = 12,66$ ;  $p < 0,0001$ ]. Também é possível observar que a resposta ao teste da acetona dos animais do grupo FO foi semelhante ao do grupo FO + DIA 30

mg/kg (Fig. 17D). Entretanto, somente os animais lesionados e tratados com diacereína na dose de 30 mg/kg, mas não na dose de 3 mg/kg, apresentaram redução significativa da hiperalgesia ao frio no 3º dia após a lesão [ $F_{(5, 35)} = 5,797$ ;  $p=0,0005$ ], tendo diferença significativa ao comparar com o grupo lesionado (LNI) [ $F_{(4, 28)} = 12,66$ ;  $p<0,0001$ ] (Fig. 17E). A figura 17F apresenta os dados da área sob a curva e claramente mostra diferença significativa entre os grupos [ $F_{(4, 35)} = 15,14$ ;  $p<0,0001$ ], sendo que a diacereína na dose de 30 mg/kg, mas não dose de 3 mg/kg, promoveu redução significativa da hiperalgesia ao frio, comparado ao grupo lesionado (LNI) ( $p=0,0020$ ).

Figura 17 – Efeito da diacereína sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio observada nos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.



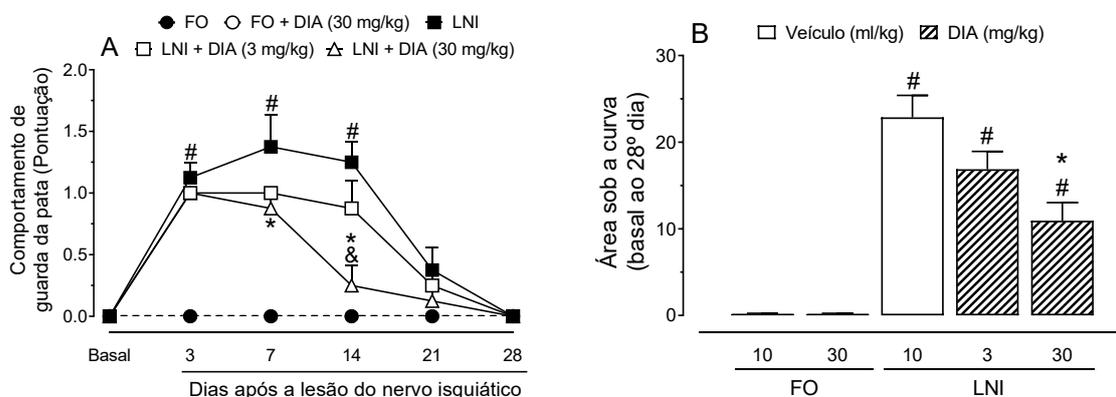
Legenda: Von frey de frequência (figuras A e B) e teste da acetona (figuras D e E) avaliados em diferentes momentos (antes da lesão (basal) e 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dia após LNI). Análise estatística realizada pela ANOVA de duas vias medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni. Área sob a curva do von frey (figura C) e do teste da acetona (figura F). Análise estatística realizada pela ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Os valores representam média  $\pm$  EPM de 8 animais por grupo. Sustenido (#) mostra diferença significativa quando comparado aos grupos falso-operados (FO e FO+DIA 30 mg/kg); O asterisco (\*) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo operado (LNI); (&) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo LNI+DIA (3 mg/kg). Fonte: da autora.

## 5.2 EFEITO DA DIACEREÍNA NO COMPORTAMENTO DE GUARDA DA PATA (DOR ESPONTÂNEA) EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS OU NÃO À LNI.

A lesão por esmagamento do nervo isquiático induziu o comportamento de guarda da pata, um indicador de dor espontânea, nos animais do grupo LNI ao longo das avaliações (do 3º dia até o 14º dia após a lesão) [ $F_{(5, 35)} = 56,36$ ;  $p < 0,0001$ ], tendo diferença significativa com os animais dos grupos falso-operados [ $F_{(4, 28)} = 48,13$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. 18A). Foi observado também que a pontuação do comportamento de guarda dos animais do grupo FO foi semelhante ao do grupo FO + DIA 30 mg/kg (Fig. 18A). Além disso, foi evidente que os animais lesionados e tratados com diacereína de 30 mg/kg apresentaram uma pontuação significativamente menor do 7º ao 14º dia após a lesão [ $F_{(5, 35)} = 56,36$ ;  $p < 0,0001$ ], tendo diferença significativa com os grupos LNI e LNI + DIA 3 mg/kg [ $F_{(4, 28)} = 48,13$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. 18A).

Esses resultados são destacados na figura 18B, gráfico da área sob a curva, o qual mostra diferença significativa entre os grupos [ $F_{(4, 35)} = 15,14$ ;  $p < 0,0001$ ], onde a diacereína na dose de 30 mg/kg, promoveu redução significativa da pontuação do comportamento de guarda, comparado ao grupo lesionado (LNI) ( $p = 0,0020$ ). Isso demonstra que os animais apresentaram comportamento relacionado à hiperalgesia e o tratamento com diacereína de 30 mg/kg foi capaz de minimizá-lo.

Figura 18 – Efeito da diacereína na dor espontânea observada nos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.



Legenda: Comportamento de guarda da pata (dor-espontânea). **A:** Avaliação em diferentes momentos (antes da lesão (basal) e 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dia após LNI). Análise estatística realizada pela ANOVA de duas vias medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni. **B:** Área sob a curva (basal até 28º dia após a lesão). Análise estatística realizada pela ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Os valores representam média  $\pm$  EPM de 8 animais por grupo. Sustenido (#) mostra diferença significativa

quando comparado aos grupos falso-operados (FO e FO+DIA 30 mg/kg); Asteriscos (\*) mostra a diferença significativa quando comparado ao grupo LNI; (&) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo LNI+DIA 3 mg/kg. Fonte: da autora.

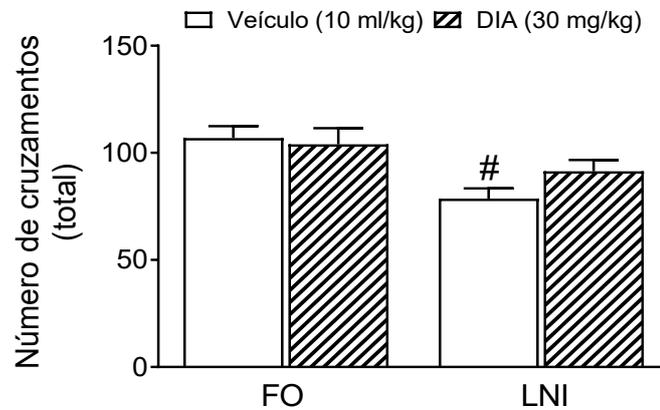
### 5.3 EFEITO DA DIACEREÍNA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS SUBMETIDOS OU NÃO AO ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO.

No 10º dia após a LNI foi realizado o teste do campo aberto com o objetivo de avaliar se a lesão do nervo isquiático e/ou o tratamento com diacereína influenciam na locomoção dos animais.

De acordo com a análise estatística feita pela ANOVA de duas vias, verificamos que houve diferença significativa na variável lesão [ $F_{(1, 28)} = 12,08$ ;  $p=0,0017$ ], e ao analisar os grupos pelo pós-teste de Bonferroni, observa-se que os animais do grupo submetido a lesão do nervo isquiático e tratado com veículo apresentaram diminuição significativa da locomoção comparado aos grupos falso-operados (FO e FO+DIA 30 mg/kg) ( $p<0,03$ ). Além disso, verificamos que ambos os grupos falso-operados (FO e FO + DIA 30 mg/kg) apresentaram uma atividade locomotora semelhante, sendo que não houve diferença significativa entre eles ( $p>0,999$ ), indicando que a diacereína por si só não prejudica a deambulação, ou seja, não influencia negativamente na atividade locomotora dos animais (Fig. 19).

Por outro lado, não houve diferença significativa na variável tratamento [ $F_{(1, 28)} = 0,7049$ ;  $p=0,4082$ ], onde o grupo de animais lesionados e tratados com diacereína na dose de 30 mg/kg, não apresentaram diferença significativa com os demais grupos ( $p>0,4$ ), mesmo assim, observamos um aumento no número totais de cruzamentos em relação ao grupo LNI tratado com veículo, indicando que após o tratamento não houve prejuízo na locomoção (Fig. 19).

Figura 19 – Efeito da diacereína sobre atividade locomotora observada nos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.



Legenda: Atividade locomotora dos animais avaliada no 10º dia após a LNI. Os valores representam média  $\pm$  EPM de 8 animais por grupo. A coluna em branco representa os animais que receberam veículo e as colunas hachuradas os animais que receberam diacereína de 30 mg/kg, sendo FO (falso-operado) e LNI (lesão do nervo isquiático). Análise estatística realizada pela ANOVA de duas vias medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni. Sustenido (#) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo falso-operado (FO e FO+DIA 30 mg/kg). Fonte: da autora.

#### 5.4 EFEITO DA DIACEREÍNA NA RECUPERAÇÃO MOTORA DE ANIMAIS SUBMETIDOS OU NÃO AO ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO

Ao analisar o índice funcional dinâmico do nervo isquiático (IFD) (Fig. 20A-C), foi verificado que todos os animais avaliados antes da lesão, e os animais dos grupos falso-operados (FO e FO + DIA 30 mg/kg) avaliados ao longo do tempo, apresentaram índice funcional próximo de 0, indicando função motora normal. Após o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático até o 14º dia de avaliação, observamos que os animais do grupo LNI apresentaram déficit funcional significativo [ $F_{(5, 35)} = 55,39$ ;  $p < 0,0001$ ], sendo essa diferença significativa em relação aos grupos falso-operados (FO e FO+30 mg/kg) [ $F_{(4, 28)} = 30,12$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. 20A). Por outro lado, os animais tratados com diacereína na dose de 30 mg/kg, mas não na dose de 3 mg/kg, apresentaram recuperação motora que foi significativa até o 7º dia de avaliação [ $F_{(5, 35)} = 55,39$ ;  $p < 0,0001$ ] e permaneceu elevada, porém não significativa até o 14º dia após a lesão, sendo essa diferença significativa em relação aos animais do grupo LNI [ $F_{(4, 28)} = 30,12$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. 20B).

Esses resultados são destacados na figura 20C, gráfico da área sob a curva, o qual mostra diferença significativa entre os grupos  $F_{(4, 35)} = 21,67$ ;  $P < 0,0001$ . Observa-se a presença de déficit motor nos animais dos grupos LNI e LNI+DIA 3

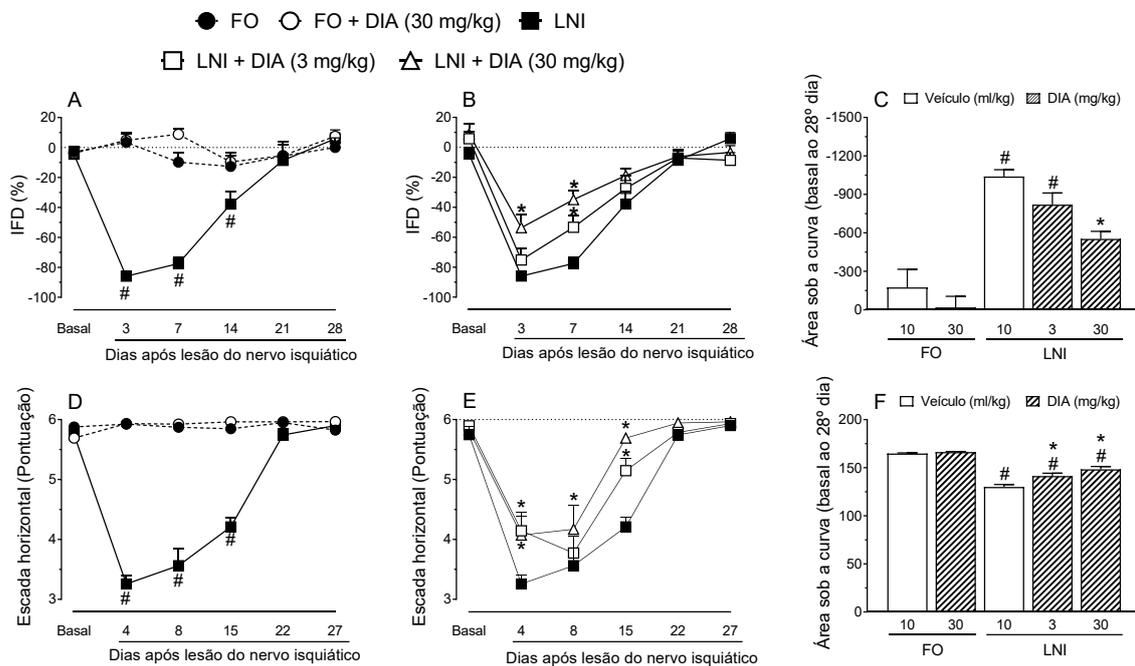
mg/kg comparados aos animais dos grupos falso-operados ( $p < 0,0002$ ), além de evidenciar a recuperação motora significativa do grupo de animais tratados com diacereína na dose de 30 mg/kg comparado ao grupo LNI ( $p = 0,0065$ ).

Com relação ao teste da escada horizontal (Fig. 20 D-F), verificamos que na avaliação basal (antes da lesão), bem como os grupos falso-operados, apresentaram uma pontuação próxima de 6, o que indica uma função motora normal. Após a lesão até o 15º dia de avaliação, verificamos que os animais do grupo LNI apresentaram uma pontuação menor demonstrando prejuízo significativo da função motora [ $F_{(5, 35)} = 149,6$ ;  $p < 0,0001$ ], sendo essa diferença significativa em relação aos grupos falso-operados (FO e FO+30 mg/kg) [ $F_{(4, 28)} = 46,51$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. 20D). Em contrapartida, os animais lesionados e tratados com diacereína, principalmente na dose de 30 mg/kg, apresentaram significativa recuperação motora no decorrer do tempo, do 3º ao 15º dia após a lesão [ $F_{(5, 35)} = 149,6$ ;  $p < 0,0001$ ], tendo diferença significativa em relação ao grupo LNI [ $F_{(4, 28)} = 46,51$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. 20E).

A figura 20F apresenta a área sob a curva e mostra diferença significativa entre os grupos [ $F_{(4, 35)} = 47,87$ ;  $p < 0,0001$ ], onde os grupos submetidos ao esmagamento do nervo isquiático, independente do tratamento, comparados aos grupos falso-operados, apresentaram déficit significativo da função motora após a lesão ( $p < 0,0001$ ). Além disso, houve diferença significativa dos grupos tratados com diacereína comparado ao grupo LNI, o que evidencia uma melhora da recuperação motora após o tratamento ( $p < 0,0097$ ).

Por fim, ambas as avaliações mostraram resultados semelhantes e destacam que a lesão por esmagamento do nervo isquiático ocasiona déficit funcional nos animais e que a diacereína tem potencial para recuperar a função motora.

Figura 20 - Efeito da diacereína na recuperação funcional dos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.



Legenda: Figuras A e B - Índice funcional dinâmico (n = 8 animais por grupo). Figuras D e E - Escada horizontal (n = 7 animais por grupo). Análise estatística realizada pela ANOVA de duas vias medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni. Área sob a curva do IFD do nervo isquiático (figura C) e da escada horizontal (figura F). Análise estatística realizada pela ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Os valores representam média  $\pm$  EPM. Sustenido (#) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo falso-operado (FO e FO+DIA 30 mg/kg); Asteriscos (\*) mostra a diferença significativa quando comparado ao grupo LNI. Fonte: da autora.

## 5.5 EFEITO DA DIACEREÍNA NA DISFUNÇÃO EMOCIONAL DO TIPO DEPRESSIVO CAUSADA PELO ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO

Nesta etapa do estudo, entre o 5º e o 16º dia após o esmagamento do nervo isquiático, foram realizados testes comportamentais para verificar se a lesão é capaz de induzir um comportamento de desesperança e anedonia nos animais, os quais estão associados ao comportamento depressivo em humanos, e diante disto analisar o efeito da diacereína sob esse tipo de comportamento.

Para analisar o teste da suspensão pela cauda, nado forçado e preferência por sacarose foi utilizado ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Para analisar o teste do ninho foi utilizado teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

No teste da suspensão pela cauda (Fig. 21A), verificamos que houve diferença significativa na variável lesão [ $F(1, 32) = 5,137, p=0,03$ ]. Onde observamos

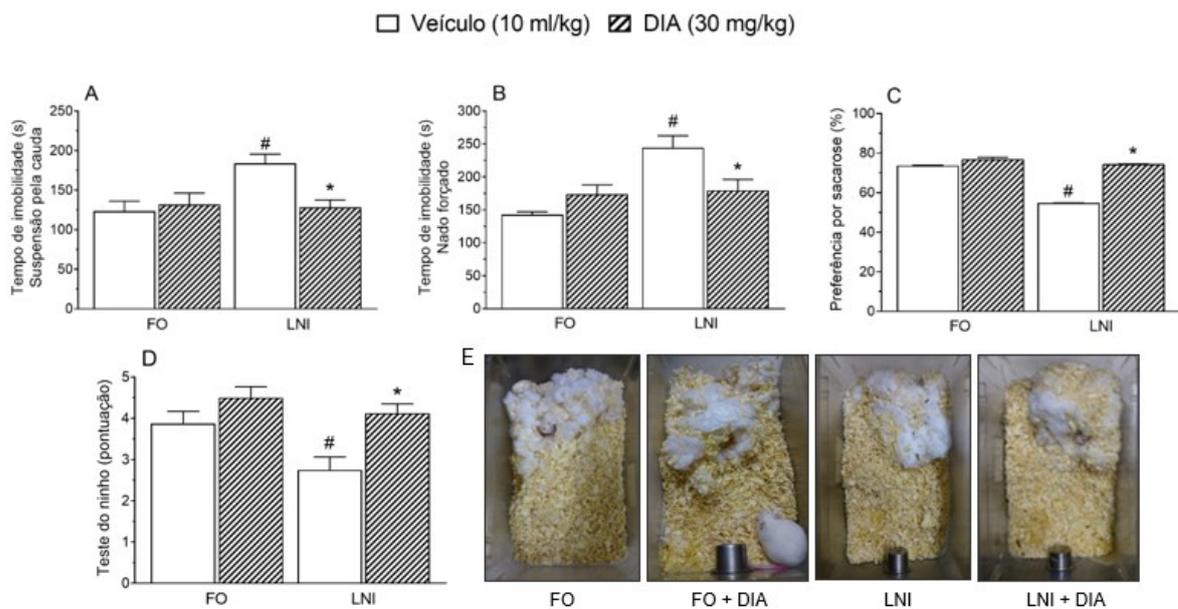
que os animais dos grupos falso-operados apresentaram tempo de imobilidade semelhante, sem diferença significativa entre eles ( $p > 0,999$ ). Em contrapartida, houve aumento significativo do tempo de imobilidade no grupo LNI tratado com veículo comparado aos grupos falso-operados (FO e FO + DIA 30 mg/Kg) ( $p = 0,0302$ ), caracterizando um comportamento tipo-depressivo nesses animais. Além disso, verificamos diferença significativa entre as variáveis lesão e tratamento [ $F_{(1, 32)} = 6,542$ ,  $p = 0,0155$ ], onde os animais do grupo lesionado e tratado com diacereína na dose de 30 mg/kg (LNI+DIA 30 mg/kg) apresentaram uma diminuição significativa do tempo de imobilidade, comparado ao grupo LNI tratado com veículo ( $p = 0,0177$ ).

O teste do nado forçado (Fig. 21B) também foi utilizado para avaliar o comportamento de desesperança nos animais. Os resultados mostraram que houve diferença significativa na variável lesão [ $F_{(1, 32)} = 11,54$ ,  $p = 0,0018$ ]. Sendo que os grupos falso-operados não apresentaram diferença significativa no tempo de imobilidade ( $p > 0,999$ ). Entretanto, os animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático (grupo LNI tratado com veículo) apresentaram o comportamento tipo-depressivo, com aumento significativo do tempo de imobilidade em relação aos grupos falso-operados ( $p < 0,0201$ ). Adicionalmente, também observamos diferença significativa entre as variáveis lesão e tratamento [ $F_{(1, 32)} = 9,313$ ,  $p = 0,0046$ ], sendo que os animais com lesão tratados com diacereína na dose de 30 mg/kg apresentaram tempo de imobilidade significativamente menor em relação ao grupo LNI tratado com veículo ( $p = 0,0377$ ).

A figura 21C apresenta os resultados do teste de preferência por sacarose. Verificamos que a lesão por esmagamento do nervo isquiático causou o comportamento de anedonia nos camundongos. Os resultados mostraram diferença significativa na variável lesão [ $F_{(1, 68)} = 399,8$ ,  $p < 0,0001$ ], onde o grupo LNI tratado com veículo apresentou uma diminuição significativa do consumo de sacarose quando comparado aos grupos falso-operados (FO+ veículo e FO+DIA 30 mg/kg) ( $p < 0,0001$ ). Por outro lado, também houve diferença significativa na variável tratamento [ $F_{(1, 68)} = 456,4$ ,  $p < 0,0001$ ], onde o grupo lesionado e tratado com diacereína na dose de 30mg/kg foi capaz de aumentar a preferência por sacarose, apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo LNI ( $p < 0,0001$ ), além de atingir percentual semelhante ao grupo falso-operado tratado com diacereína na dose de 30mg/kg ( $p > 0,999$ ).

Com relação ao bem-estar animal (Fig. 21 D e E), verificamos que o grupo submetido somente à lesão e tratado com veículo (LNI) apresentou uma pontuação significativamente menor ( $p=0,0006$ ) em relação ao grupo falso-operado (FO + DIA 30 mg/kg). Interessantemente, os animais lesionados e tratados com a DIA 30 mg/kg apresentaram uma pontuação semelhante aos grupos falso-operados ( $p>0,999$ ) e significativamente diferente ao grupo LNI tratado com veículo ( $p=0,0284$ ) (Fig. 21D). A figura 21E, mostra imagens representativas do ninho formado por cada grupo experimental. Destacamos a imagem do grupo LNI + DIA que apresenta um ninho semelhante ao dos grupos falso-operados (FO e FO + DIA).

Figura 21 – Efeito da diacereína na disfunção emocional observada nos camundongos submetidos ou não ao esmagamento do nervo isquiático.



Legenda: **A** – Suspensão pela cauda (n= 9 por grupo). **B** – Nado forçado (n= 9 por grupo). **C** – Preferência por sacarose (n= 9 por grupo). **D** – Teste do ninho (n= 9 por grupo). **E** – Fotos do teste do ninho representando cada grupo. Os valores representam média  $\pm$  EPM. A coluna em branco representa os animais que receberam veículo e as colunas hachuradas os animais que receberam diacereína, sendo FO (falso-operado), LNI (lesão do nervo isquiático) e DIA (diacereína). Para os resultados do gráfico A, B e C foi feita a análise estatística pela ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Para os resultados do gráfico D foi realizada a estatística pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Sustenido (#) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo falso-operado (FO+veículo e FO+DIA 30 mg/kg). Asterisco (\*) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo LNI tratado com veículo. Fonte: da autora.

## 5.6 EFEITO DA DIACEREÍNA NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA APÓS A LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO

Nesta etapa da pesquisa (experimento II), os animais foram eutanasiados no 15º dia após a lesão e após foi coletado o nervo isquiático direito para a histologia. Foi utilizado os seguintes grupos: FO, FO + DIA (30 mg/kg), LNI e LNI + DIA (30 mg/kg) e realizado as análises morfométricas e morfológicas.

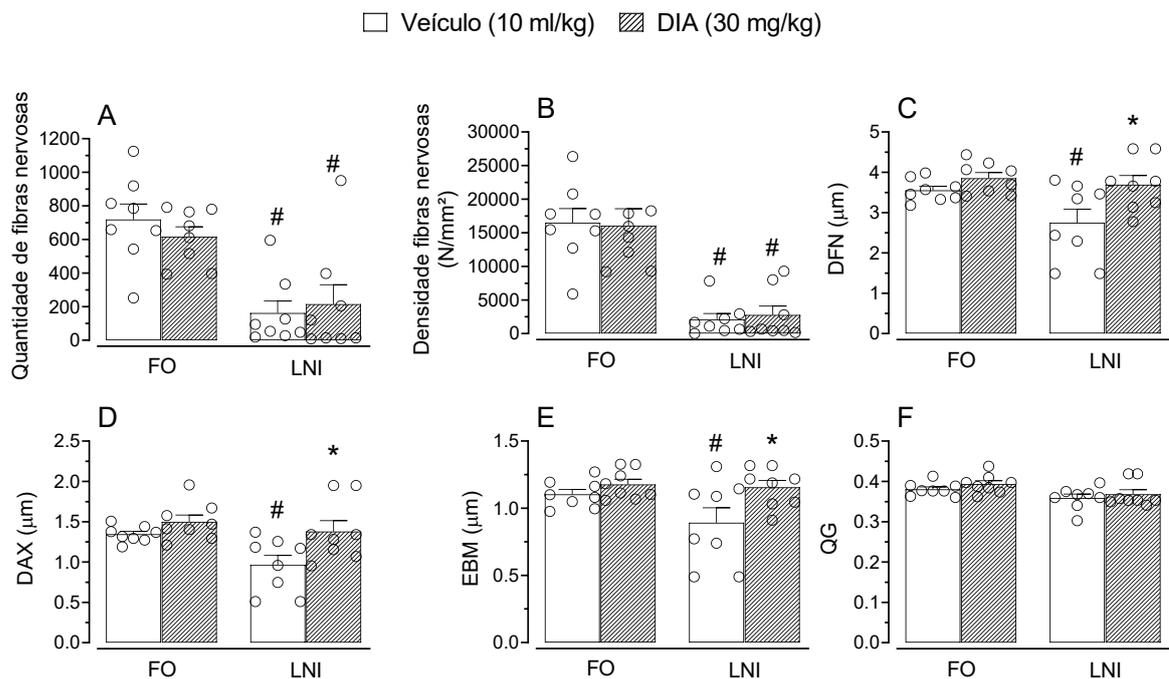
### 5.6.1 Morfometria do nervo isquiático

De acordo com a análise estatística realizada pela ANOVA de duas vias com pós-teste de Newman-Keuls, os resultados mostram que os grupos falso-operados (FO + veículo e FO+DIA 30 mg/kg) apresentaram valores semelhantes, sem diferença significativa, em relação a quantidade de fibras nervosas e a densidade das fibras nervosas (Fig. 22 A e B). Entretanto, os animais dos grupos submetidos à lesão, independente do tratamento, diminuíram significativamente tanto a quantidade de fibras nervosas [ $F_{(1, 28)} = 37,52$ ;  $p = 0,0001$ ] (Fig. 22A), bem como a densidade das fibras [ $F_{(1, 28)} = 57,48$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. 21B), quando comparados aos grupos falsos operados.

Nos resultados das figuras 22 C, D e E, constatamos pela ANOVA de duas vias que houve diferença significativa na variável lesão ao analisar os seguintes parâmetros: diâmetros da fibra nervosa (DFN) [ $F_{(1, 28)} = 4,824$ ;  $p = 0,0365$ ] (Fig. 22C), do axônio (DAX) [ $F_{(1, 28)} = 6,270$ ;  $p = 0,0184$ ] (Fig. 22D) e a espessura da bainha de mielina (EBM) [ $F_{(1, 28)} = 6,086$ ;  $p = 0,0200$ ] (Fig. 22E). Diante disto, verificamos pelo pós-teste de Newman-Keuls que o grupo LNI tratado com veículo diminuiu consideravelmente esses parâmetros, quando comparado aos grupos falso-operados (FO + veículo e FO + DIA 30 mg/kg) ( $p < 0,05$ ). Além disso, observamos também diferença significativa em relação a variável tratamento, onde o grupo tratado com diacereína (LNI + DIA 30 mg/kg) apresentou um aumento significativo do DFN [ $F_{(1, 28)} = 7,998$ ;  $p = 0,0086$ ] (Fig. 22C), DAX [ $F_{(1, 28)} = 8,127$ ;  $p = 0,0081$ ] (Fig. 22D) e da EBM [ $F_{(1, 28)} = 11,20$ ;  $p = 0,0023$ ] (Fig. 22E), quando comparado ao grupo LNI tratado com veículo, além de apresentar valores próximos aos dos grupos falso-operados, indicando uma possível maturação da fibra nervosa.

Já o quociente G (QG) não apresentou diferença significativa entre os grupos [F (1, 28) = 0,04516; p = 0,8332], demonstrando que o nervo, mesmo após a lesão, apresenta uma boa velocidade de condução nervosa, com valores semelhantes aos dos grupos falso-operados (Fig. 22F).

Figura 22 – Efeito da diacereína na regeneração nervosa periférica após lesão do nervo isquiático: análise morfométrica



Legenda: Morfometria do nervo isquiático direito realizada no 15º dia após o procedimento cirúrgico. Os valores representam média ± E.P.M de 8 animais por grupo. As colunas em branco representam os animais que receberam veículo e as colunas hachuradas os animais que receberam diacereína, sendo FO (falso-operado), LNI (lesão do nervo isquiático), DIA (diacereína), (DAX) diâmetro do axônio, (DFN) diâmetro da fibra nervosa, (EBM) espessura da bainha de mielina e (QG) quociente G. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de duas vias com pós-teste de Newman-Keuls. Sustenido (#) mostra diferença significativa quando comparado aos grupos falso-operados (FO e FO+DIA 30 mg/kg). Asterisco (\*) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo LNI tratado com veículo. Fonte: da autora.

### 5.6.2 Efeito da diacereína na regeneração nervosa periférica após lesão do nervo isquiático: análise morfológica.

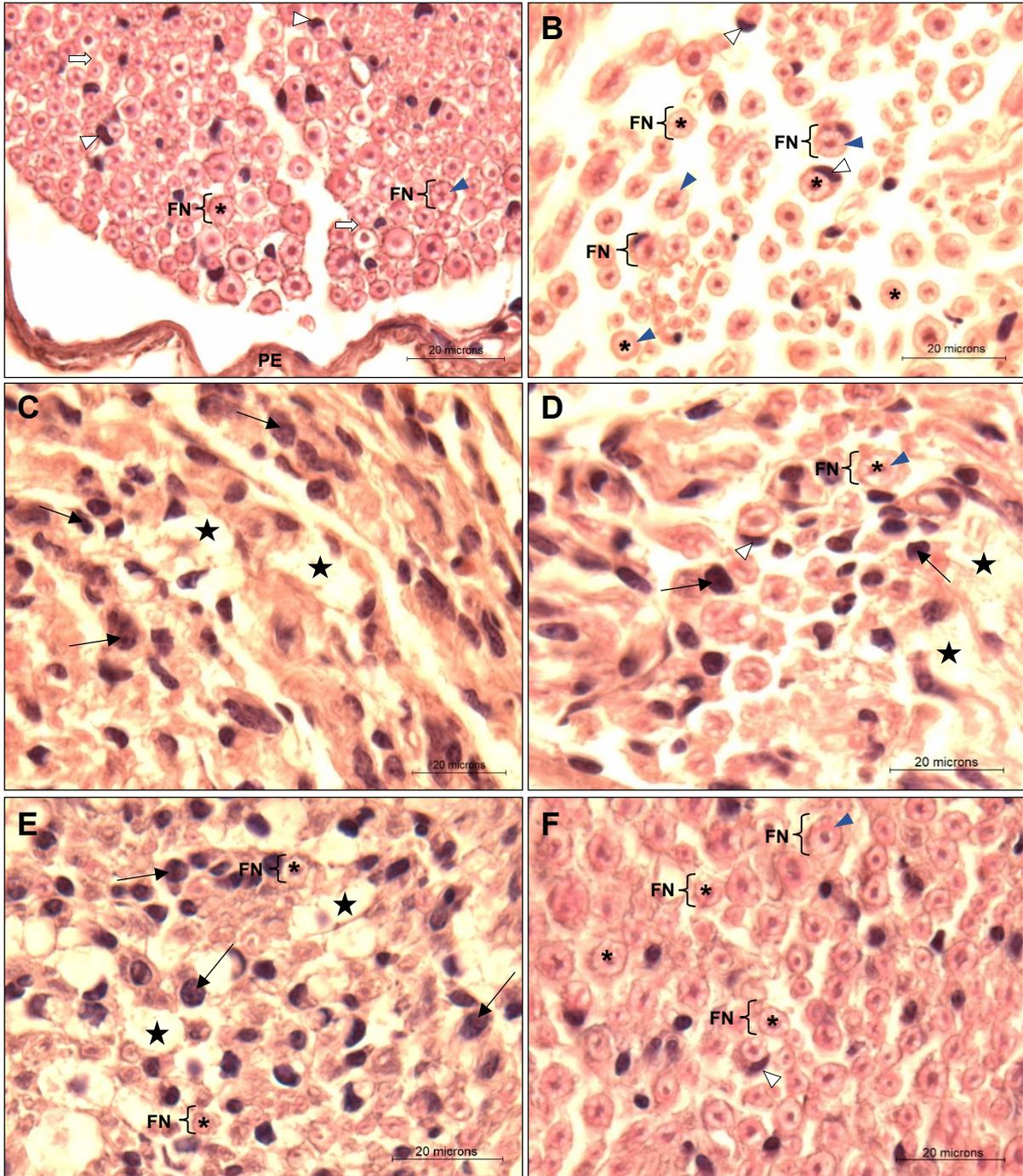
Análise morfológica do nervo isquiático foi realizada no 15º dia após a lesão. Neste período, nós observamos que ambos os grupos falso-operados (FO e FO+DIA 30 mg/kg) apresentaram aspecto morfológico normal, com seus envoltórios

conjuntivos íntegros (como epineuro, perineuro e endoneuro). As fibras nervosas também se mostraram normais, com os axônios envoltos por bainha de mielina, e núcleos de células de Schwann na periferia da fibra (Fig. 23A e 23B).

Nos grupos submetidos à lesão (Fig. 23C a 23F), principalmente no grupo sem tratamento (LNI), verificou-se que o modelo de esmagamento do nervo isquiático do presente estudo foi eficiente para causar lesão do tipo axonotmese, pois a análise histológica do nervo mostrou eventos morfológicos característicos da degeneração Walleriana (como destruição tecidual, degeneração das fibras nervosas e aumento de células inflamatórias).

No grupo submetido à lesão sem tratamento (LNI), o processo de degeneração foi mais evidente, apresentando intensa resposta inflamatória e diminuição da quantidade de fibras nervosas (Fig. 23C e 23D). Já o grupo lesionado e tratado com diacereína (LNI+DIA 30 mg/kg), apresentou aspectos morfológicos diferentes do grupo LNI. Houve melhora da organização tecidual e recuperação das fibras nervosas, com diminuição do infiltrado inflamatório, diminuição das áreas em degeneração e aumento da quantidade de fibras nervosas (Fig. 23E e 23F).

Figura 23 - Morfologia do nervo isquiático.



Legenda: Fotomicrografias em corte transversal do segmento distal do nervo isquiático de camundongos Swiss no 15º dia após a lesão, coloração com hematoxilina e eosina. Foi utilizado a objetiva de 100x com escala de 20 µm. **A** - Grupo falso-operado tratado com veículo e **B** - Grupo falso-operado tratado com diacereína na dose de 30 mg/kg, nesses grupos observa-se uma organização tecidual com perineuro (PE), endoneuro (seta branca), grande quantidade de fibras nervosas intactas (FN), mostrando axônio (\*) e bainha de mielina (ponta de seta azul), além de núcleos de possíveis células de Schwann (ponta de seta branca). **C** e **D** – Grupo com lesão tratado com veículo (LNI), as imagens mostram uma desorganização tecidual com intensa resposta inflamatória (seta preta) e áreas com degeneração (estrela) e poucas fibras nervosas íntegras (FN) com axônio (\*) e bainha de mielina (ponta de seta azul). **E** e **F** – Grupo com lesão tratado com diacereína (LNI + DIA 30mg/kg) mostra

melhora na organização do tecido com diminuição das células inflamatórias, aumento de fibras nervosas íntegras (FN) com axônio (\*) e bainha de mielina (ponta de seta azul) e apresenta possíveis núcleos da célula de Schwann (ponta de seta branca). Fonte: da autora.

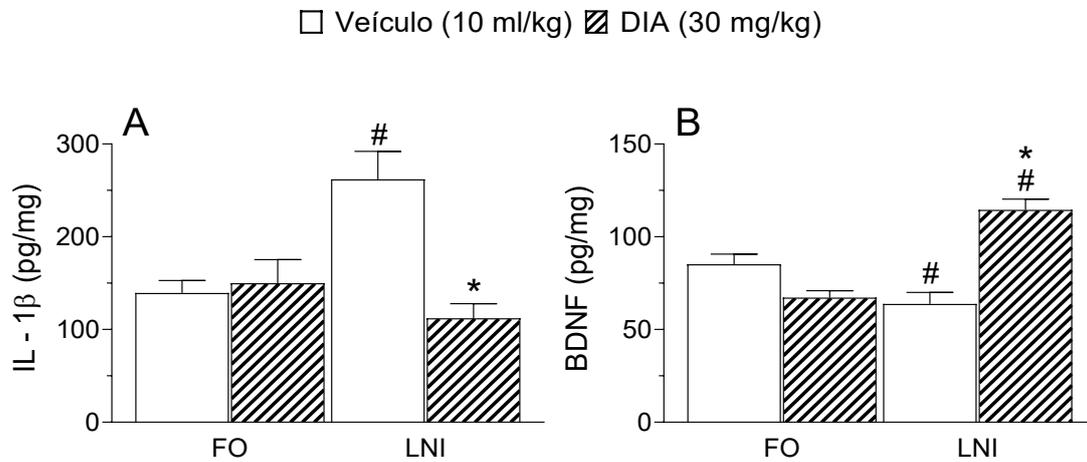
### 5.7 EFEITO DA DIACEREÍNA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA IL-1 $\beta$ E DO FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DO ENCÉFALO (BDNF) NO NERVO ISQUIÁTICO.

Nesta etapa da pesquisa (Experimento III), foi coletado o nervo isquiático no 7º dia após a lesão a fim de verificar os níveis de IL-1 $\beta$  e BDNF por meio de ELISA. Esse experimento foi realizado nos seguintes grupos: FO, FO + DIA (30 mg/kg), LNI e LNI + DIA (30 mg/kg).

De acordo com os resultados da ANOVA de duas vias com pós-teste de Newman-Keuls, constatamos que a concentração da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  permaneceu alta no grupo de animais submetidos à lesão e tratados com veículo (LNI + veículo), apresentando diferença significativa quando comparado aos grupos falso-operados [ $F_{(1,27)} = 13,23$ ;  $p=0,0011$ ]. Contudo, foi observado que o grupo com lesão e tratado com diacereína (grupo LNI+DIA 30 mg/kg) apresentou uma redução significativa na concentração dessa citocina em relação ao grupo LNI tratado com veículo [ $F_{(1,27)} = 9,944$ ;  $p=0,0039$ ], além disso, o grupo LNI+DIA 30 mg/kg não apresentou diferença significativa com os grupos falso-operados (Fig. 24A).

Com relação ao BDNF, foi utilizado a mesma análise estatística e verificamos que após a lesão houve uma redução na concentração de BDNF no grupo LNI tratado com veículo, sendo significativamente diferente do grupo falso-operado [ $F_{(1,28)} = 5,701$ ;  $p=0,0239$ ]. Além disso, observamos que o grupo lesionado e tratado com diacereína (grupo LNI + DIA 30 mg/kg) apresentou níveis significativamente maiores de BDNF quando comparado ao grupo LNI tratado com veículo [ $F_{(1,28)} = 9,101$ ;  $p<0,0054$ ] (Fig. 24B).

Figura 24 - Efeito da diacereína sobre a concentração de IL-1 $\beta$  e de BDNF no nervo isquiático de camundongos.



Legenda: Níveis de IL-1 $\beta$  (A) e de BDNF (B) no nervo isquiático de camundongos no 7<sup>o</sup> após cirurgia de LNI. Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. As colunas em branco representam os animais que receberam veículo e as colunas hachuradas os animais que receberam diacereína, sendo FO (falso-operado), LNI (lesão do nervo isquiático) e DIA (diacereína). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de duas vias com pós-teste de Newman-Keuls. Sustenido (#) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo falso-operado (FO). Asterisco (\*) mostra diferença significativa quando comparado ao grupo LNI tratado com veículo. Fonte: da autora.

## 6 DISCUSSÃO

Lesões nervosas periféricas traumáticas geram grande incapacidade física, principalmente nos adultos jovens em idade produtiva. Essas lesões podem ocorrer por esmagamento e até por ruptura completa do nervo periférico, sendo que, para conseguir a recuperação completa é necessário a regeneração axonal e a reinervação de órgãos-alvo. A falha de qualquer um desses processos pode gerar uma recuperação incompleta, acarretando déficits funcionais e dor neuropática comumente observado em pacientes com lesões dos nervos periféricos (ROBINSON, 2000; ROTSHENKER, 2011).

Neste contexto, diferentes modelos experimentais de lesão traumática do nervo são amplamente pesquisados, com o intuito de investigar alterações moleculares e celulares que ocorrem no nervo lesionado (GEUNA, 2015; SAVASTANO et al., 2014). Dentre esses modelos, comumente é encontrado nos estudos o procedimento de esmagamento do nervo isquiático. Esse procedimento cirúrgico geralmente é realizado por meio de uma pinça que exerce a compressão ou esmagamento do nervo, sem resultar em uma transecção completa dele, ocorrendo neste caso uma axonotmese (BRIDGE et al., 1994). Neste modelo a análise das alterações morfológicas após uma lesão são também evidentes e desejáveis, o que torna possível analisar a regeneração tecidual (MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013).

Apesar de diversas pesquisas abordarem a fisiopatologia da lesão nervosa periférica, ainda são escassos estudos com tratamentos que sejam capazes de acelerar a recuperação da função sensório-motora e da regeneração do nervo (MENORCA; FUSSELL; ELFAR, 2013). Com isso, esta pesquisa teve a intenção de estudar o efeito do fármaco diacereína na lesão nervosa periférica.

Neste estudo utilizamos as doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg da diacereína, e para relacionar essas doses com a clínica, a literatura apresenta cálculos capazes de converter as doses utilizadas nos animais em doses equivalentes aos seres humanos com base na área de superfície corporal (ANDRADE et al., 2016; NAIR; JACOB, 2016). Desta maneira, verificamos que as doses utilizadas no estudo correspondem as doses de 0,24 mg/Kg, 0,81 mg/Kg e 2,43 mg/Kg de diacereína, respectivamente, para um humano. Diante disto, verificamos que as doses utilizadas nos animais foram diferentes do que é utilizado na clínica ao tratamento da

osteoartrite, mas é importante ressaltar que a diacereína neste estudo foi utilizada como forma de tratamento em um modelo de lesão do nervo periférico e que os animais que receberam a diacereína apresentaram pouco ou nenhum efeito adverso (diarreia) com essas doses, semelhante ao encontrado no estudo de SILVA et al. (2017) que utilizou a dose de 30 mg/kg da diacereína e esse fármaco não produziu alterações gastrointestinais.

Com relação aos primeiros resultados referentes aos testes comportamentais com a finalidade de avaliar a função sensório-motora. Verificamos, desde o início das avaliações comportamentais, que os animais submetidos à lesão por esmagamento do nervo isquiático apresentaram hiperalgesia mecânica e térmica. A hiperalgesia térmica ao frio ficou evidente no 3º dia após a lesão e não foi mais observada após o 7º dia de avaliação. No entanto, os animais permaneceram com hiperalgesia mecânica até 28º dia após a indução da neuropatia.

Estes dados estão de acordo com outras pesquisas que também utilizaram o mesmo modelo de lesão para desenvolver novas estratégias terapêuticas (GEUNA, 2015). Bobinski et al. (2011) mostraram em seu estudo que a lesão por esmagamento do nervo produziu hiperalgesia nos camundongos a partir do 7º dia após a indução da neuropatia e a hiperalgesia ao frio a partir do 3º dia após a lesão. NASCIMENTO et al. (2015) mostraram que os animais apresentaram hiperalgesia a partir do 6º dia após a LNI. Ambos os estudos evidenciaram dor neuropática associada a lesão nervosa em camundongos, sendo que a metodologia que utilizaram foi semelhante à do presente estudo, apresentando o mesmo método de indução de neuropatia e forma de avaliação da hiperalgesia mecânica.

Entretanto, nosso estudo apresenta um diferencial comparado aos trabalhos comentados anteriormente, em relação ao início da dor neuropática e principalmente o momento que começa o efeito do tratamento. O quadro álgico se iniciou a partir do 3º dia após a lesão do nervo isquiático e a partir deste mesmo período os animais tratados com diacereína começaram a apresentar redução da hiperalgesia, este efeito persistiu até o final do tratamento, sendo que a dose 30 mg/kg da diacereína apresentou melhor resposta terapêutica do que as demais doses testadas (3 mg/kg e 10 mg/kg).

Para confirmar as observações anteriores, uma medida semi-quantitativa caracterizada pelo comportamento de proteção da pata foi utilizada como um

indicativo de dor espontânea nos animais, sendo determinada por uma pontuação de 0 a 5 que analisa o posicionamento da pata (GREGORY et al., 2013). Neste teste observamos que os animais com LNI apresentaram uma pontuação de proteção da pata superior aos animais falso-operados, demonstrando um quadro de dor espontânea. Sendo que nos animais tratados com diacereína de 30 mg/kg a pontuação diminuiu consideravelmente. Este dado reafirma que a diacereína é capaz de acelerar o processo de recuperação do animal, possuindo efeito anti-hiperalgésico desde o início da lesão.

Por mais que a literatura ainda não apresente trabalhos relacionando o modelo de esmagamento do nervo com a diacereína, nossos resultados corroboram com o estudo de QUINTÃO et al. (2005), que submeteram os animais à modelos de dor inflamatória e neuropática. No modelo de dor inflamatória os animais receberam uma injeção intraplantar com carragenina ou com o adjuvante completo de Freund (CFA), e foram tratados com diacereína (doses 25-100 mg/kg), e verificaram, por meio do teste do von frey, que este fármaco inibiu a alodinia mecânica.

Adicionalmente, também induziram a LNP por meio do modelo de ligadura parcial do nervo isquiático e foi verificado que a administração da diacereína nas doses testadas reduziu a alodinia mecânica, mas não de maneira dose dependente. No entanto, o efeito antialodínico da diacereína cessou 2 dias após a interrupção do tratamento. Embora o método e o modelo de lesão aplicados no nosso trabalho sejam diferentes do encontrado no estudo de QUINTÃO et al. (2005), em ambos a diacereína se mostrou efetiva e apresentou efeitos satisfatórios, apontando este fármaco como importante alternativa para o tratamento da dor neuropática.

Além disso, segundo a literatura, um dos eventos que contribuem para a iniciação e manutenção da dor neuropática é o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . Logo após a lesão do nervo periférico, essas citocinas são liberadas por diversas células, como mastócitos e macrófagos, tanto no local da lesão como na região distal à lesão, o que favorece o processo inflamatório e resulta no dano axonal (KREMER et al., 2020; SCHOLZ; WOOLF, 2007). Sendo que a IL-1 $\beta$  atinge um pico de secreção já no 1º dia após a lesão (ROTSHENKER, 2011).

No estudo atual, também verificamos que os animais com lesão e tratados com veículo apresentaram concentrações elevadas de IL-1 $\beta$  comparado aos demais grupos experimentais. Desta forma, o aumento das citocinas inflamatórias é

importante na gênese e manutenção da neuropatia, sendo que a citocina IL-1 $\beta$  parece ser responsável, pelo menos em parte, pela hiperalgesia dos animais após a lesão por esmagamento, demonstrada nas avaliações comportamentais da presente pesquisa (CIDRAL-FILHO et al., 2013; GUI et al., 2016; LEES et al., 2015; REN; TORRES, 2009).

Trabalhos apontam que a diacereína se destaca como um fármaco anti-hiperalgésico, devido a seu principal mecanismo de ação, que é a inibição dessas citocinas pró-inflamatórias, especialmente a IL-1 $\beta$  (PANOVA; JONES, 2015; PAVELKA et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Ademais, no nosso estudo os animais com lesão do nervo isquiático e tratados com a diacereína, desde o 1º dia após a lesão, apresentaram uma redução significativa da concentração de IL-1 $\beta$  no nervo isquiático ipsilateral à lesão, o que corrobora com a literatura. Diante disto, percebe-se que o mecanismo de ação da diacereína, reduzindo IL-1 $\beta$ , contribui para seu efeito anti-hiperalgésico.

Quando se trata de uma lesão do nervo periférico é importante salientar que dentre as suas consequências existe também o déficit motor ou perda da funcionalidade do membro, já que a inervação para os músculos está comprometida (BOBINSKI et al., 2011; GRINSELL; KEATING, 2014; MARTINS et al., 2011, MARTINS et al., 2018). Neste estudo, a funcionalidade em parte foi avaliada por meio da locomoção dos animais no teste do campo aberto, e mais diretamente através do índice funcional dinâmico e pela escada horizontal.

O teste do campo aberto teve o intuito de verificar o efeito da LNI na locomoção dos animais e relacionar com o quadro algico, além de mostrar que o fármaco utilizado no estudo apresenta efeito anti-hiperalgésico sem comprometer a capacidade locomotora dos animais. Segundo a literatura, se a locomoção do animal estiver comprometida devido ao tratamento com fármaco a análise dos testes comportamentais que envolvam o comportamento motor do animal pode estar prejudicada (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). De acordo com esse teste, verificamos que os animais com lesão do nervo isquiático, diminuíram a locomoção comparados com os animais sem lesão (falso-operados), e que os animais submetidos à lesão e tratados com diacereína (30 mg/kg) não apresentaram prejuízo na locomoção. Além disso, observamos que o tratamento com diacereína não possui um efeito sedativo, já que não houve diferença significativa entre os grupos falso-

operados (FO e FO + DIA). Esses dados ressaltam que a diminuição da locomoção ocorreu devido ao quadro de hiperalgesia após a lesão, e que o tratamento foi capaz de restaurar a locomoção dos animais.

Ao avaliar a funcionalidade pelo índice funcional dinâmico, são comparados parâmetros das pegadas normal e experimental por uma fórmula matemática, o que fornece informações sobre a recuperação das conexões sensório-motoras relacionadas com a marcha (BAPTISTA et al., 2007).

Assim, os parâmetros mensurados, como o comprimento da pata (PL) e o espalhar dos dedos (TS), são considerados importantes para avaliar a funcionalidade dos animais. TS é a medida mais importante para verificar a disfunção da marcha quando ocorre a LNI. Este parâmetro pode ser usado isoladamente como um indicativo do estágio da lesão. O PL expressa a capacidade dos músculos gastrocnêmios e sóleo de manter o calcanhar elevado durante a caminhada em roedores. Como esses músculos são inervados pelo nervo isquiático, quando debilitados, não conseguem manter o ângulo normal do tornozelo, deixando que uma porção maior da pata fique em contato com o chão (BAPTISTA et al., 2007; INSERRA; BLOCH; TERRIS, 1998).

Já na avaliação pela escada horizontal, os animais precisam caminhar ao longo de uma escada horizontal na qual o espaçamento dos degraus é variável e é periodicamente alterado. As mudanças no espaçamento dos degraus impedem que os animais aprendam a localização correta dos degraus e, assim, minimiza a capacidade dos animais de compensar as deficiências através do aprendizado. Além disso, alterar o espaçamento entre os degraus permite que o teste seja usado repetidamente em estudos de longo prazo (METZ; WHISHAW, 2009).

Desta forma, verificou-se na presente pesquisa que o modelo de lesão proposto gerou déficits funcionais evidenciados pelos testes do índice funcional dinâmico e pela escada horizontal. O déficit funcional permaneceu até o 15º dia após a lesão de esmagamento do nervo isquiático. Este efeito pode ser decorrente de uma lesão do nervo que também afeta o componente muscular e gera hipotrofia resultando em uma diminuição da força muscular e de déficit funcional. Além disso, os animais apresentaram quadro algico o qual pode ter contribuído com a perda funcional (GRINSELL; KEATING, 2014). Contudo, constatamos que os animais tratados com a diacereína na dose de 30 mg/kg apresentaram recuperação motora logo nos primeiros

dias após a lesão, tanto pela avaliação do índice funcional dinâmico quanto pela escada horizontal, mostrando um efeito inédito deste fármaco na neuropatia.

De acordo com a literatura, um dos problemas que também prejudica a recuperação funcional é o crescimento lento das fibras nervosas lesionadas (COBIANCHI et al., 2017). E uns dos mecanismos relacionados com a recuperação motora é a produção de fatores neurotróficos após a lesão do nervo periférico. Esses fatores neurotróficos são peptídeos que regulam a sobrevivência neuronal e o crescimento dos axônios, os quais são produzidos pelas células de Schwann e pelos fibroblastos durante a degeneração walleriana (ROTSHENKER, 2011). Dentre eles o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) contribui fortemente com a regeneração nervosa periférica (MCGREGOR; ENGLISH, 2019).

Vale destacar também que existem importantes vias intracelulares que quando ativadas, por meio de receptores específicos, acabam sendo responsáveis pelo processo de regeneração e conseqüentemente pela recuperação sensório-motora (BOYD; GORDON, 2003; COBIANCHI et al., 2017). Um exemplo é a ligação do BDNF em seu receptor tirosina kinase B (trkB), ativando a via PI3K-Akt e Ras-ERK, promovendo a sobrevivência e a regeneração axonal (COBIANCHI et al., 2017). Alguns estudos mostram que o BDNF endógeno é necessário para a regeneração e remielinização dos nervos periféricos lesionados (BOYD; GORDON, 2003; ZHANG et al., 2000). Entretanto, em casos de lesões mais graves, alternativas terapêuticas que aumentem esse suporte trófico acabam sendo benéficas para a regeneração (COBIANCHI et al., 2017).

Zheng et al., (2016) demonstraram que a administração de BDNF resulta na recuperação funcional de camundongos após lesão do nervo isquiático. Para a análise funcional foi utilizado o teste de espalhar dos dedos, o qual verificou que o grupo de animais submetidos à lesão do nervo isquiático e o grupo com lesão e tratado com anti-BDNF apresentaram déficits motores, ao contrário do grupo administrado com BDNF que recuperou a função motora. Outra análise realizada foi a histológica onde o BDNF aumentou a porcentagem de axônios mielinizados.

Comparando nosso trabalho com a literatura, verificamos que os níveis de BDNF no nervo isquiático estavam significativamente mais altos no grupo com lesão e tratado com diacereína na dose de 30 mg/kg comparado ao grupo lesão e tratado com veículo (LNI). Ainda não se sabe ao certo qual o mecanismo de ação do fármaco

em relação ao aumento do BDNF, entretanto a literatura mostra que a liberação de BDNF pelas células de schwann é um fato importante para auxiliar na regeneração do nervo (WILHELM et al., 2012; ZHANG et al., 2000). Assim, acredita-se na hipótese de que o aumento da concentração de BDNF, talvez a nível celular por meio das células de schwann, pode ter auxiliado na regeneração nervosa e na recuperação motora dos camundongos. Tal fato, pode ser corroborado pelos achados encontrados nos estudos histológicos e morfométricos do nervo isquiático lesionado ou não e tratados com diacereína.

A análise histológica foi baseada em parâmetros que avaliam principalmente o número e a densidade de fibras nervosas, os diâmetros relacionados com as fibras nervosas (DFN, DAX e EBM) e o quociente G (relacionado com a velocidade de condução nervosa). Todas essas variáveis juntamente com a análise funcional são importantes para fazer um vínculo com a regeneração (GEUNA et al., 2001).

Os resultados referentes a morfologia do nervo nos mostram que o grupo lesionado apresentou características referentes ao processo de degeneração Walleriana, com desorganização tecidual e presença de células do processo inflamatório. Esses resultados corroboram com outros artigos que também mostraram degeneração das fibras nervosas após lesão do nervo isquiático (BOBINSKI et al., 2011; MARTINS et al., 2011).

Contudo, no grupo lesionado e tratado com a diacereína, houve uma recuperação das fibras nervosas, com diminuição das áreas em degeneração e aparentemente um aumento de fibras nervosas intactas. Na morfometria observamos que não houve diferença significativa entre os grupos na análise do quociente G, o que pode demonstrar que a velocidade de condução nervosa está preservada (TEODORI et al., 2011). O número e a densidade de axônios diminuíram nos grupos submetidos à lesão, entretanto no grupo com lesão e tratado com diacereína foi observado um aumento em todos os diâmetros relacionados com a fibra nervosa (DFN, DAX e DBM). Tais achados reafirmam que o tratamento com diacereína tem potencial terapêutico para auxiliar na regeneração nervosa e assim melhorar a função motora após a lesão do nervo.

Em nosso estudo, procuramos ainda confirmar que a lesão nervosa periférica pode contribuir com o aparecimento da disfunção da emocionalidade, além do quadro de dor e da perda da funcionalidade já confirmado e descrito anteriormente. De uma

maneira geral, existe robustas evidências na literatura que mostram que transtornos de humor, como a depressão, são frequentemente observados em pacientes que sofrem com a dor neuropática (CHERIF et al., 2020; LU; LI; LIU, 2019; TORTA; IERACI; ZIZZI, 2017). Ademais, alguns estudos pré-clínicos também corroboram com a associação de disfunção emocional como o comportamento do tipo depressivo presente em animais submetidos a lesão do nervo periférico (KREMER et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2015; YALCIN; BARTHAS; BARROT, 2014) Para este estudo, foram utilizados os testes de suspensão pela cauda, nado forçado, preferência por sacarose e o teste do ninho, e os resultados mostraram que a lesão nervosa gera alterações na emocionalidade e que a diacereína foi capaz de minimizar o comportamento tipo-depressivo e melhorar o bem-estar animal.

As principais teorias que envolvem o surgimento da depressão estão relacionadas com as alterações no metabolismo das neuroaminas, onde há uma menor disponibilidade de dopamina, serotonina e/ou noradrenalina no sistema nervoso central. Entretanto, a fisiopatologia da depressão também tem sido associada principalmente com um intenso processo inflamatório no sistema nervoso central, que implica no envolvimento de diversas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e principalmente da IL-1 $\beta$  (FAROOQ et al., 2017; LEES et al., 2015).

Nascimento et al. (2015) mostraram que o modelo de esmagamento do nervo isquiático induz comportamento tipo-depressivo nos animais, o qual foi avaliado pelo teste da suspensão pela cauda e pelo nado forçado. Os autores ainda demonstram que os níveis elevados de TNF- $\alpha$  no nervo isquiático, hipocampo e córtex pré-frontal desempenham um papel importante na dor neuropática induzida pela LNI, bem como no comportamento tipo-depressivo.

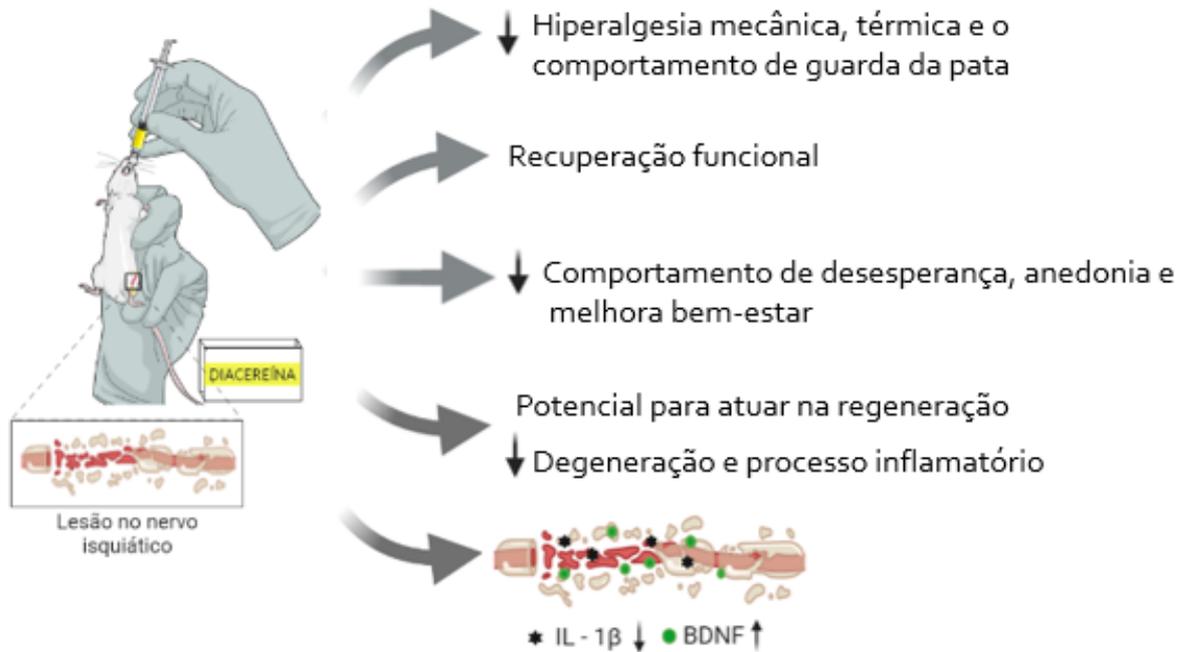
GUI et al., (2016) mostraram que o aumento da concentração de IL-1 $\beta$  é uma das causas de dor crônica, déficits de memória e comportamento depressivo em condições que envolvem lesão no sistema nervoso periférico. Em seu estudo uma das avaliações utilizadas para verificar o comportamento tipo-depressivo foi o nado forçado, e constataram que os animais após a lesão apresentaram aumento do tempo de imobilidade. Além disso, foi verificado aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  no nervo isquiático, no plasma e em outras regiões do sistema nervoso central (SNC) como: corno dorsal da medula espinal, núcleo accumbens, hipocampo, córtex pré-frontal e na amígdala. Em contrapartida, os animais que receberam a aplicação de anticorpo

neutralizante de IL-1 $\beta$  (anti-IL-1 $\beta$ ) e os animais knockout para IL-1R1 não apresentaram, comportamento tipo-depressivo e dor neuropática (avaliada pelo von frey up down), sendo que os níveis de IL-1 $\beta$  estavam baixos nas regiões analisadas do SNC. Portanto, a IL-1 $\beta$  pode ser um alvo para a prevenção da dor neuropática e dos distúrbios cognitivos e emocionais relacionados.

Nosso estudo corrobora com a literatura, pois mostramos nos resultados que os animais com LNP apresentam comportamento tipo-depressivo (desesperança), e foi verificado níveis altos de IL-1 $\beta$  no nervo isquiático lesionado. Ao contrário dos animais lesionados e tratados com diacereína na dose de 30 mg/kg, os quais apresentaram redução do comportamento tipo-depressivo e níveis baixos de IL-1 $\beta$ . A partir disso, acreditamos que o tratamento proposto com diacereína esteja atuando sob as citocinas pró-inflamatórias como no caso da IL - 1 beta, e mesmo que neste estudo não foi analisado os níveis de IL-1 $\beta$  no sistema nervoso central, acredita-se na hipótese de que a diacereína pode estar atuando tanto em nível periférico como no SNC, minimizando assim os danos causados pela LNP, como o comportamento tipo-depressivo dos animais.

Por fim, constatamos que a diacereína consegue minimizar os danos causados pela lesão nervosa periférica e ainda apresenta potencial para atuar na regeneração do nervo periférico (Fig. 25). Este trabalho gerou conhecimento e proporcionou que novos estudos dentro dessa área sejam realizados, a fim de complementar os resultados com outras análises como imuno-histoquímicas e bioquímicas que possam reforçar o mecanismo de ação da diacereína na lesão nervosa periférica, e assim abrir caminho para os estudos que envolvam a pesquisa clínica.

Figura 25 – Diacereína como alternativa terapêutica na lesão nervosa periférica: evidências obtidas utilizando o modelo de esmagamento do nervo isquiático em camundongos.



Legenda: A figura mostra os efeitos do tratamento com diacereína em camundongos submetidos a lesão do nervo isquiático. Fonte: Elaborada pela autora, usando o programa *Mind the Graph* e *Biorender*.

## 7 CONCLUSÃO

Considerando os resultados da presente pesquisa concluímos que:

- O tratamento com diacereína, principalmente na dose de 30 mg/kg, reduz a hiperalgesia mecânica e térmica, além de minimizar o comportamento de guarda da pata nos animais submetidos a lesão do nervo isquiático;
- A diacereína (30 mg/kg) foi capaz de recuperar a função motora, minimizar comportamento de desesperança, anedonia e melhorar o bem-estar dos animais lesionados;
- Foi constatado também que a diacereína (30 mg/kg) tem potencial para atuar na regeneração do nervo periférico. A análise histológica apresentou melhora na morfologia geral do nervo pela diminuição da degeneração, do processo inflamatório e pela presença de fibras nervosas intactas. Além de aumentar o diâmetro da fibra nervosa, do axônio e a espessura da bainha de mielina.
- O tratamento com diacereína (30 mg/kg) preveniu o aumento da concentração de IL - 1 $\beta$  (citocina presente na dor neuropática) e promoveu o aumento de BDNF (fator de crescimento que também está relacionado com a regeneração do nervo periférico).

Diante disto, o tratamento com diacereína após uma lesão do nervo isquiático, mostra resultados satisfatórios tanto na recuperação sensório-motora, como no restabelecimento dos transtornos emocionais e bem-estar e na regeneração do nervo periférico. Fornecendo subsídios para que novas pesquisas sejam realizadas, na área pré-clínica e principalmente na área clínica.

Por fim, esses dados analisados em conjunto, fornecem evidências científicas para o uso terapêutico incremental da diacereína nas condições patológicas associada a lesões nervosas periféricas.

## REFERÊNCIAS

- ALANT, J. D. D. V. et al. The impact of motor axon misdirection and attrition on behavioral deficit following experimental nerve injuries. **Plos One**, v. 8, n. 11, p. 1–16, nov. 2013.
- ALLES, S. R. A.; SMITH, P. A. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 315–347, apr. 2018.
- ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. **Progress in neurobiology**, v. 98, n. 1, p. 16–37, july. 2012.
- ALVITES, R. et al. Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. **Cogent Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1–45, 1 jan. 2018.
- ANDRADE, E. L. et al. Non-clinical studies in the process of new drug development-Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 12, p. 1–19, 2016.
- ANTUNES, J. S. et al. Histological Analysis of Wistar Rats Sciatic Nerves Subjected to Compression and Treated with Low Level Laser Therapy and Neural Mobilization. **Malang Neurology Journal**, v. 5, n. 2, p. 55–60, 2019.
- ATTAL, N. et al. Further evidence for “pain-related” behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. **Pain**, v. 41, n. 2, p. 235–251, may. 1990.
- BAPTISTA, A. F. et al. A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse-Adaptation of the sciatic static index. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 161, n. 2, p. 259–264, apr. 2007.
- BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337–348, oct. 2011.
- BOTA, O.; FODOR, L. The influence of drugs on peripheral nerve regeneration. **Drug Metabolism Reviews**, v. 51, n. 3, p. 266–292, aug. 2019.
- BOYD, J. G.; GORDON, T. Neurotrophic Factors and Their Receptors in Axonal Regeneration and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. **Molecular Neurobiology**, v. 27, n. 3, p. 277–323, june. 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, may. 1976.

BRAHMACHARI, B.; CHATTERJEE, S.; GHOSH, A. Efficacy and safety of diacerein in early knee osteoarthritis: A randomized placebo-controlled trial. **Clinical Rheumatology**, v. 28, n. 10, p. 1193–1198, july. 2009.

BRIDGE, P. M. et al. Nerve Crush Injuries - A Model for Axonotmese. **Experimental Neurology**, v. 127, n. 2, p. 284–290, june. 1994.

BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical focus**, v. 16, n. 5, p. 1–7, may. 2004.

CAILLAUD, M. et al. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 1, p. 24–33, jan. 2019.

CAN, A. et al. The Mouse Forced Swim Test. **Journal of Visualized Experiments**, v. 59, p. 4–8, jan. 2011.

CASTILLO-GALVÁN, M. L. et al. Study of peripheral nerve injury in trauma patients. **Gaceta medica de Mexico**, v. 150, n. 6, p. 527–32, nov./dec. 2014.

CATTIN, A.-L.; LLOYD, A. C. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 39, p. 38–46, aug. 2016.

CHAN, K. M. et al. Improving peripheral nerve regeneration: From molecular mechanisms to potential therapeutic targets. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 826–835, nov. 2014.

CHEN, P.; PIAO, X.; BONALDO, P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Acta Neuropathologica**, v. 130, n. 5, p. 605–618, nov. 2015.

CHERIF, F. et al. Depression Prevalence in Neuropathic Pain and Its Impact on the Quality of Life. **Pain Research and Management**, v. 2020, p. 1–8, 2020.

CHUI, J. et al. Perioperative peripheral nerve injury after general anesthesia: A qualitative systematic review. **Anesthesia and Analgesia**, v. 127, n. 1, p. 134–143, july. 2018.

CIARAMITARO, P. et al. Traumatic peripheral nerve injuries: epidemiological findings, neuropathic pain and quality of life in 158 patients. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 15, p. 120–127, june. 2010.

COBIANCHI, S. et al. Neuroprotective Effects of Exercise Treatments After Injury: The Dual Role of Neurotrophic Factors. **Current neuropharmacology**, v. 15, n. 4, p. 495–518, may. 2017.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor- $\alpha$  levels levels after sciatic nerve crush in mice. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 8, p. 1193–1204, 2013.

CONCEA - RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA Nº 37, DE 18 DE NOVEMBRO DE 2018

CONCEIÇÃO, C. P. et al. Controle de qualidade de cápsulas manipuladas de diacereína. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 93, n. 2, p. 265–269, june. 2012.

CURRAN, M. W. T. et al. Acetyl-L-carnitine to enhance nerve regeneration in carpal tunnel syndrome: A double-blind, randomized, controlled trial. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 143, n. 1, p. 111e-120e, jan. 2019.

DAMY, S. B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103–111, 2010.

DEACON, R. M. Assessing nest building in mice. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1117–1119, aug. 2006.

DEFRANCESCO-LISOWITZ, A. et al. The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. **Neuroscience**, v. 302, p. 174–203, aug. 2015.

DOAN, L.; MANDERS, T.; WANG, J. Neuroplasticity underlying the comorbidity of pain and depression. **Neural Plasticity**, v. 2015, p. 1–16, feb. 2015.

DONEDDU, P. E. et al. Tarsal tunnel syndrome: still more opinions than evidence. Status of the art. **Neurological Sciences**, v. 38, n. 10, p. 1735–1739, oct. 2009.

ESER, F. et al. Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. **Neurology India**, v. 57, n. 4, p. 434–437, july/aug. 2009.

FAROOQ, R. K. et al. Role of inflammatory cytokines in depression: Focus on interleukin-1 $\beta$ . **Biomedical Reports**, v. 6, n. 1, p. 15–20, nov. 2017.

FAWCETT, J. W.; VERHAAGEN, J. Intrinsic Determinants of Axon Regeneration. **Developmental Neurobiology**, v. 78, n. 10, p. 890–897, oct. 2018.

FERNANDEZ, L. et al. Emerging Strategies on Adjuvant Therapies for Nerve Recovery. **Journal of Hand Surgery**, v. 43, n. 4, p. 368–373, apr. 2018.

FIDELIX, T. S. A. et al. Diacerein for osteoarthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. 1–69, feb. 2014.

FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 109, n. 1–2, p. 150–161, may. 2004.

FONSECA-RODRIGUES, D. et al. Emotional and cognitive impairments in the peripheral nerve chronic constriction injury model (CCI) of neuropathic pain: A systematic review. **Behavioural Brain Research**, v. 399, p. 1–14, fev. 2020.

FOSTER, C. H. et al. Trends and Cost-Analysis of Lower Extremity Nerve Injury Using the National Inpatient Sample. **Neurosurgery**, v. 85, n. 2, p. 250–256, 2019.

GADOTTI, V. M. et al. Diacerein decreases visceral pain through inhibition of glutamatergic neurotransmission and cytokine signaling in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 102, n. 4, p. 549–554, oct. 2012.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 1–13, aug. 2011.

GEUNA, S. et al. Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. **Anatomy and Embryology**, v. 203, n. 6, p. 1–10, 2001.

GEUNA, S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 243, p. 39–46, mar. 2015.

GREGORY, N. S. et al. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 11, p. 1255–1269, nov. 2013.

GRINSELL, D.; KEATING, C. P. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, sept. 2014.

GUI, W. S. et al. Interleukin-1 $\beta$  overproduction is a common cause for neuropathic pain, memory deficit, and depression following peripheral nerve injury in rodents. **Molecular Pain**, v. 12, n. 74, p. 1–15, may. 2016.

HÖKE, A. Mechanisms of Disease: What factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 8, p. 448–454, aug. 2006.

HUSSAIN, G. et al. Current status of therapeutic approaches against peripheral nerve injuries: A detailed story from injury to recovery. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 1, p. 116–134, jan. 2020.

INSERRA, M. M.; BLOCH, D. A.; TERRIS, D. J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, v. 18, n. 2, p. 119–124, 1998.

IRINTCHEV, A. Potentials and limitations of peripheral nerve injury models in rodents with particular reference to the femoral nerve. **Annals of anatomy**, v. 193, n. 4, p. 276–285, jul. 2011.

JENSEN, R. K. et al. Diagnosis and treatment of sciatica. **The BMJ**, v. 367, p. 1–6, nov. 2019.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R.; LLOYD, A. C. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 7, p. 1–15, may. 2015.

KIM, W. et al. Combined Effects of Bee Venom Acupuncture and Morphine on Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Mice. **Toxins**, v. 8, n. 2, p. 1–11, jan. 2016.

KONGTHARVONSKUL, J. et al. Efficacy and safety of glucosamine, diacerein, and NSAIDs in osteoarthritis knee: a systematic review and network meta-analysis. **European journal of medical research**, v. 20, n. 1, p. 1–11, mar. 2015.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; GRAÇA, C. R.; FERREIRA, V. F. M. Peripheral nerve injuries: A retrospective survey of 1124 cases. **Neurology India**, v. 65, n. 3, p. 551–555, jun. 2017.

KOUYOUMDJIAN, J. A. Peripheral nerve injuries: A retrospective survey of 456 cases. **Muscle and Nerve**, v. 34, n. 6, p. 785–788, dec. 2006.

KRAEUTER, A.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Nest Building Test in Mice for Assessment of General Well-Being. In: **Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols, Methods in Molecular Biology**. v. 1916, p. 87–91.

KREMER, M. et al. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *European Journal of Neuroscience*, v. 00, p. 1–35, jan. 2020.

LEES, J. G. et al. Cytokines in neuropathic pain and associated depression. **Modern Trends in Pharmacopsychiatry**, v. 30, p. 51–66, sept. 2015.

LOUTHRENOO, W. et al. The efficacy, safety and carry-over effect of diacerein in the treatment of painful knee osteoarthritis: a randomised, double-blind, NSAID-controlled study. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 6, p. 605–614, jun. 2007.

LU, Y.; LI, J.; LIU, Y. Depression as a mediator of quality of life in patients with neuropathic pain: A cross-sectional study. **Journal of Advanced Nursing**, v. 75, n. 11, p. 2719–2726, 2019.

LYKISSAS, M. et al. The Role of Neurotrophins in Axonal Growth, Guidance, and Regeneration. **Current Neurovascular Research**, v. 4, n. 2, p. 143–151, may. 2007.

MACHELSKA, H. Control of neuropathic pain by immune cells and opioids. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 559–570, aug. 2011.

MANOUZE, H. et al. Effects of single cage housing on stress, cognitive, and seizure parameters in the rat and mouse pilocarpine models of epilepsy. **eNeuro**, v. 6, n. 4, p. 1–23, july. 2019.

MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P. Effects of diacerein at the molecular level in the osteoarthritis disease process. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 2, n. 2, p. 95–104, apr. 2010.

MARTINS, R. S. et al. Traumatic injuries of peripheral nerves: a review with emphasis on surgical indication. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 71, n. 10, p. 811–4, oct. 2013.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. **Pain**, v. 152, n. 11, p. 2653–2661, 2011.

MARTINS, D. F. et al. Long-Term Regular Eccentric Exercise Decreases Neuropathic Pain-like Behavior and Improves Motor Functional Recovery in an Axonotmesis Mouse Model: the Role of Insulin-like Growth Factor-1. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 7, p. 6155–6168, jul. 2018.

MCGREGOR, C. E.; ENGLISH, A. W. The role of BDNF in peripheral nerve regeneration: Activity-dependent treatments and Val66Met. **Frontiers in Cellular**, v. 12, p. 1-22, jan. 2019.

MEDINACELI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An Index of the Functional Based on Measurements Condition of Rat Sciatic Nerve Made from Walking Tracks. **Experimental Neurology**, v. 77, n. 3, p. 634–643, sept. 1982.

MENORCA, R. M. G.; FUSSELL, T. S.; ELFAR, J. C. Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery. **Hand Clinics**, v. 29, n. 3, p. 317–330, aug. 2013.

METZ, G. A.; WHISHAW, I. Q. The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. **Jove**, v. 12, n. 28, p. 1–4, june. 2009.

MIETTO, B. S.; MOSTACADA, K.; MARTINEZ, A. M. B. Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 1–14, mar. 2015.

MIRANDA, G. E.; TORRES, R. Y. Epidemiology of traumatic peripheral nerve injuries evaluated with electrodiagnostic studies in a tertiary care hospital clinic. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 35, n. 2, p. 76–80, june 2016.

MODRAK, M. et al. Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. **Journal of Neuroscience Research**, v. 98, n. 5, p. 780–795, may. 2020.

NAIR, A.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NASCIMENTO, F. P. et al. Thalidomide reduces mechanical hyperalgesia and depressive-like behavior induced by peripheral nerve crush in mice. **Neuroscience**, v. 303, p. 51–58, sept. 2015.

- NETO, O. A. et al. **Dor princípios e prática**. Porto alegre: Artmed, 2009.
- NICKEL, F. T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 81–91, feb. 2012.
- NICOLAS, P. et al. Clinical Pharmacokinetics of Diacerein. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 35, n. 5, p. 347–359, nov. 1998.
- NUCCI, C. et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 170–178, aug. 2012.
- OHAYON, M. M.; SCHATZBERG, A. F. Chronic pain and major depressive disorder in the general population. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 7, p. 454–461, may. 2010.
- OSBORNE, N. R.; ANASTAKIS, D. J.; DAVIS, K. D. Peripheral nerve injuries, pain, and neuroplasticity. **Journal of Hand Therapy**, v. 31, n. 2, p. 184–194, apr. 2018.
- PANAGOPOULOS, G. N.; MEGALOIKONOMOS, P. D.; MAVROGENIS, A. F. The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration. **Orthopedics**, v. 40, n. 1, p. 141–156, jan. 2017.
- PANOVA, E.; JONES, G. Benefit–Risk Assessment of Diacerein in the Treatment of Osteoarthritis. **Drug Safety**, v. 38, n. 3, p. 245–252, mar. 2015.
- PAVELKA, K. et al. Diacerein: Benefits, Risks and Place in the Management of Osteoarthritis. An Opinion-Based Report from the ESCEO. **Drugs Aging**, v. 33, n. 2, p. 75–85, feb. 2016.
- PELLETIER, J. P. et al. Efficacy and safety of diacerein in osteoarthritis of the knee: A double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 10, p. 2339–2348, oct. 2000.
- PHAN, D. Q. D.; SCHUIND, F. Tolerance and effects of FK506 (tacrolimus) on nerve regeneration: A pilot study. **Journal of Hand Surgery: European Volume**, v. 37, n. 6, p. 537–543, july. 2012.
- POSSO, I. DE P. et al. Epidemiology of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, p. 11–14, 2016.
- QUINTÃO, N. L. M. et al. The effects of diacerhein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice. **Anesthesia and Analgesia**, v. 101, n. 6, p. 1763–1769, dec. 2005.
- RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: Concepts, challenges and compromises. **Pain**, v. 00, n. 00, p. 1-7, may. 2020.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 57–64, abr. 2009.

RIBEIRO, T. et al. Blockade of ATP P2X7 receptor enhances ischiatic nerve regeneration in mice following a crush injury. **Brain Research**, v. 1669, p. 69–78, aug. 2017.

RIGAUD, M. et al. Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: Implications for studies of neuropathic pain. **Pain**, v. 136, n. 1–2, p. 188–201, may. 2008.

ROBINSON, L. R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle and Nerve**, v. 23, n. 6, p. 863–873, june. 2000.

RODRÍGUEZ, F. J.; VALERO-CABRÉ, A.; NAVARRO, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 1, n. 2, p. 177–185, nov. 2004.

ROTSHENKER, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, p. 1–14, aug. 2011.

SAVASTANO, L. E. et al. Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. **Journal of neuroscience methods**, v. 227, p. 166–180, apr. 2014.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1361–1368, nov. 2007.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 6, n. 96, p. 1–6, feb. 2015.

SILVA, M. D. et al. Diacerein reduces joint damage, pain behavior and inhibits transient receptor potential vanilloid 1, matrix metalloproteinase and glial cells in rat spinal cord. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 20, n. 10, p. 1337–1349, Oct. 2017.

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Revista Neurociências**, v. 15, n. 3, p. 226–233, jan. 2007.

SJEKLOCHA, L.; GATZ, J. D. Traumatic Injuries to the Spinal Cord and Peripheral Nervous System. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 39, n. 1, p. 1–28, fev. 2021.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, mar. 1985.

- TEODORI, R. M. H. et al. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. **Neural Plasticity**, v. 2011, p. 1-8, dec. 2011.
- THATTE, M. R. et al. Peripheral Nerve Injury to the Lower Limb: Repair and Secondary Reconstruction. **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 52, n. 1, p. 93–99, may. 2019.
- TODOROVIC, S. M.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. Neuropathic pain: Role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling. **European Journal of Physiology**, v. 465, n. 7, p. 921–927, july. 2013.
- TORTA, R.; IERACI, V.; ZIZZI, F. A Review of the Emotional Aspects of Neuropathic Pain: From Comorbidity to Co-Pathogenesis. **Pain and therapy**, v. 6, n. Suppl 1, p. 11–17, dez. 2017.
- TUTOGLU, A. et al. Psychological defensive profile of sciatica patients with neuropathic pain and its relationship to quality of life. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 74, n. 7, p. 646–651, Sept. 2015.
- UHELSKI, M. L.; KHASABOVA, I. A.; SIMONE, D. A. Inhibition of anandamide hydrolysis attenuates nociceptor sensitization in a murine model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Journal of Neurophysiology**, v. 113, n. 5, p. 1501–1510, mar. 2015.
- VAN HECKE, O. et al. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**, v. 155, n. 4, p. 654–662, apr. 2014.
- VASCONCELOS, F. H.; ARAÚJO, G. C. Prevalence of chronic pain in Brazil: a descriptive study. **Brazilian Journal of Pain**, v. 1, n. 2, p. 176–179, apr./june. 2018.
- WAHAB, K. W. et al. Carpal tunnel syndrome and other entrapment neuropathies. **Oman Medical Journal**, v. 32, n. 6, p. 449 – 454, nov. 2017.
- WANG, M. L. et al. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. **Connective Tissue Research**, v. 60, n. 1, p. 3–9, 2 jan. 2019.
- WILHELM, J. C. et al. Cooperative roles of BDNF expression in neurons and schwann cells are modulated by exercise to facilitate nerve regeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 14, p. 5002–5009, 2012.
- WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987.
- WOJTKIEWICZ, D. M. et al. Social impact of peripheral nerve injuries. **Hand**, v. 10, n. 2, p. 161–167, june. 2015.

YALCIN, I.; BARTHAS, F.; BARROT, M. Emotional consequences of neuropathic pain: Insight from preclinical studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 154–164, nov. 2014.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 69, n. 2, p. 482–489, nov. 2009.

ZHANG, J. Y. et al. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 4171–4180, dec. 2000.

ZHENG, J. et al. BDNF promotes the axonal regrowth after sciatic nerve crush through intrinsic neuronal capability upregulation and distal portion protection. **Neuroscience Letters**, v. 621, p. 1–8, may. 2016.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, june. 1983.

ZÚÑIGA-ROMERO, A. et al. Combination of diacerhein and antiepileptic drugs after local peripheral, and oral administration in the rat formalin test. **Drug Development Research**, v. 75, n. 8, p. 510–520, dec. 2014.