



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAYNAH DE OLIVEIRA GALASSI

**SUPLEMENTAÇÃO PREVENTIVA DE ÔMEGA-3 DIMINUI COMPORTAMENTO
DO TIPO DOR E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM UM MODELO ANIMAL
DE SÍNDROME DA DOR REGIONAL COMPLEXA DO TIPO I**

Palhoça
2020

TAYNAH DE OLIVEIRA GALASSI

**SUPLEMENTAÇÃO PREVENTIVA DE ÔMEGA-3 DIMINUI COMPORTAMENTO
DO TIPO DOR E CITOCINAS PRÓINFLAMATÓRIAS EM UM MODELO ANIMAL
DE SÍNDROME DA DOR REGIONAL COMPLEXA DO TIPO-I**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde como requisito para a obtenção
do título de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Coorientadora: Profa. Franciane Bobinski, Dra.

Palhoça

2020

G14 Galassi, Taynah de Oliveira, 1996 -

Suplementação preventiva de ômega-3 diminui comportamento do tipo dor e citocinas próinflamatórias em um modelo animal de síndrome da dor regional complexa do tipo-I / Taynah de Oliveira Galassi. – 2020.

56 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof. Daniel Fernandes Martins

Coorientação: Profa. Franciane Bobinski

1. Inflamação - Tratamento. 2. Dor - Tratamento. 3. Ácidos graxos Ômega-3. 4. Isquemia. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Bobinski, Franciane. III. Universidade do Sul de Santa Catarina. IV. Título.

CDD (21. ed.) 616.0478



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Suplementação preventiva de ômega-3 diminui comportamento do tipo dor e citocinas próinflamatórias em um modelo animal de síndrome da dor regional complexa do tipo-I.

TAYNAH DE OLIVEIRA GALASSI
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 07 de fevereiro de 2020.

Doutor Daniel Fernandes Martins (orientador)

Doutor Francisco José Cidral Filho (Avaliador externo - Integrative Health School) –
presente por videoconferência

Doutora Anna Paula Piovezan (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

*Dedico esse trabalho aos meus exemplos,
meus pais, Altair e Kátia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus por me proporcionar a oportunidade de cursar a Pós-Graduação e agora concluí-la, pela minha vida e saúde. Agradeço também por todos os obstáculos e desafios que me acrescentaram muito em sabedoria, conhecimento e crescimento profissional e pessoal.

Agradeço aos meus pais que sempre tiveram como prioridade minha formação. Obrigada por proporcionarem além de todo suporte para meu crescimento profissional, estarem presentes e serem exemplos para meu crescimento pessoal. Gratidão por apoiarem minhas decisões, por todos os momentos de aconselhamento, paciência, dedicação, compreensão e carinho que tiveram comigo durante toda minha vida, e principalmente nesses dois anos. Vocês se fizeram presentes, mesmo a quilômetros de distância e foram essenciais nessa caminhada. Amo vocês.

Uma pessoa essencial, que agradeço imensa e eternamente é o Afonso Salgado, responsável também pela minha formação e a quem dedico também esta dissertação com muito carinho. Obrigada por todo suporte, por acreditar no meu potencial, me incentivar e ser meu ponto de referência como profissional e ser humano. À você todo meu respeito, admiração, gratidão e carinho.

Minha gratidão eterna também ao meu orientador, Dr. Daniel Fernandes Martins. Muito obrigada por todos os ensinamentos, conhecimento transferido, paciência, dedicação que teve comigo durante esses dois anos. Me recebeu com muito carinho e me confiou o Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx), o qual tenho muito orgulho de trabalhar e fazer parte. Você também é meu ponto de referência como profissional e ser humano. Obrigada por tudo mesmo que fez por mim.

Agradeço também à minha coorientadora, professora Dra. Franciane Bobinski, por toda orientação que vai além do laboratório e vida profissional, pelo carinho e compreensão de sempre. A professora Dra. Anna Paula Piovezan, por todas as contribuições, sempre feitas com muito carinho, que foram essenciais para o crescimento do meu trabalho.

Agradeço aos amigos que o LaNEx e a Unisul me proporcionaram Verônica Horewicz, Daiana Salm, Daniela Ludtke. Me receberam no laboratório e são

responsáveis por muito do meu aprendizado. Obrigada pelos ensinamentos, suporte, apoio e por deixarem os dias de trabalho mais leves.

O presente trabalho foi realizado com o apoio parcial da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

*“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo, Olha para trás, para toda jornada a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas e povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre (...)
(...) E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece. Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano.”*

Osho.

RESUMO

Introdução: A síndrome da dor regional complexa do tipo I (SDRC-I) se caracteriza como uma condição clínica incapacitante, crônica, que responde de forma insatisfatória a diferentes tratamentos. É bem descrito na literatura o papel dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) ômega-3 na prevenção e tratamento de distúrbios inflamatórios e dor de origem inflamatória. Apesar de comprovados os efeitos anti-inflamatórios do ômega-3, há poucos estudos na literatura que avaliem seus benefícios terapêuticos em diferentes tipos de dor.

Objetivo: Este estudo avaliou o potencial anti-inflamatório e anti-hiperalgésico da suplementação preventiva de ômega-3 em um modelo animal de SDRC-I em camundongos.

Métodos: Camundongos fêmeas foram suplementadas durante 30 dias com ômega-3 previamente à indução do modelo da SDRC-I e 14 dias após. A hiperalgesia mecânica foi avaliada diariamente a partir do 4º dia após procedimento de isquemia e reperfusão (IR) até o 14º dia. Os animais também foram submetidos ao teste da capacidade cognitiva relacionada à dor e análise da atividade locomotora espontânea. Outros camundongos fêmeas foram suplementadas durante 30 dias com ômega-3. Em seguida, submetidos ao procedimento de IR e 24 horas após à morte indolor assistida (MIA) e retirada de amostras da medula espinal e músculo da pata posterior direita para mensuração das concentrações de citocinas pró inflamatórias TNF e IL-1 β .

Resultados: A suplementação preventiva de ômega-3 apresentou efeito anti-hiperalgésico e reduziu as concentrações das citocinas pró inflamatórias TNF na medula espinal e IL-1 β no músculo da pata dos camundongos submetidos à IR. Não foram encontradas alterações na locomoção espontânea ou diferenças estatísticas significativas no teste da capacidade cognitiva relacionada à dor dos animais suplementados com ômega-3.

Conclusão: A suplementação preventiva de ômega-3 se apresentou efetiva na redução da hiperalgesia mecânica, bem como produziu efeito anti-inflamatório reduzindo as concentrações de citocinas pró inflamatórias. A suplementação de 30 dias, na dose testada, mostrou-se segura e eficaz no modelo animal da SDRC-I e não causou efeito sedativo nos animais.

Descritores: Dor. Suplementação preventiva. Dor pós isquemia crônica. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.

ABSTRACT

Introduction: Complex regional pain syndrome type I (CRPS-I) is characterized as a chronic and disabling clinical condition that poorly responds to different treatments. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of inflammatory disorders is well described in the literature. Despite the proven anti-inflammatory effects of omega-3, there are few studies in the literature evaluating its therapeutic benefits in different types of pain.

Aim: We evaluated the potential anti-inflammatory and antihyperalgesic effects of preventive omega-3 supplementation in an animal model of CRPS-I in mice.

Methods: Female mice were supplemented for 30 days with omega-3 before the induction of the CRPS-I model and 14 days after. Mechanical hyperalgesia was daily evaluated from the 4th day after ischemia and reperfusion (IR) procedure until the 14th day. The animals were also submitted to the pain-related cognitive ability test and spontaneous locomotor activity analysis. In addition, other female mice were supplemented for 30 days with omega-3 and then subjected to the IR procedure. Twenty-four hours later, assisted painless death was conducted and samples of the spinal cord and right posterior paw muscle were taken to measure the proinflammatory cytokine TNF and IL-1 β concentrations.

Results: Preventive omega-3 supplementation elicited antihyperalgesic effects and reduced the concentrations of proinflammatory cytokines TNF in the spinal cord and IL-1 β in the paw muscle of mice subjected to IR. No changes were found in the spontaneous locomotion of animals supplemented with omega-3.

Conclusion: Preventive omega-3 supplementation was effective in reducing mechanical hyperalgesia, as well as producing anti-inflammatory effects reducing proinflammatory cytokine concentrations. The 30-day supplementation at the tested dose was safe and effective in the CRPS-I animal model and presented no sedative effects.

Keywords: Pain. Preventive supplementation. Pain following chronic ischemia. Omega-3 polyunsaturated fatty acids.

LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas

AA – Ácido araquidônico

AGPIs - Ácidos graxos poliinsaturados

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

COX – Cicloxigenase

DHA - Ácido docosa-hexaenoico (do inglês, *docosahexaenoic acid*)

DPIC - Dor pós isquemia crônica

ELISA - Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima, (do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay*)

EPA – Ácido eicosapentaenoico (do inglês, *eicosapentaenoic acid*)

EROs - Espécies reativas ao oxigênio

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

IL-8 – Interleucina-8

IL-10 – Interleucina-10

IR – Isquemia e reperfusão

LANEX - Laboratório de neurociências experimental

LOX - Lipoxigenase

MPO - Mieloperoxidase

NF κ B – Fator nuclear κ B, (do inglês, *nuclear factor κ B*)

SDRC – Síndrome da dor regional complexa

SDRC – I - Síndrome da dor regional complexa do tipo I

TNF - Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumour necrosis factor*)

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de quadros

Quadro 1 – Critérios Modificados de Budapeste.....	20
Quadro 2 - Os efeitos da suplementação preventiva com ômega-3 sobre os testes comportamentais.....	36
Quadro 3 – Os efeitos da suplementação preventiva de ômega-3 sobre os parâmetros bioquímicos.....	37

Quadro 4 – Variáveis do estudo.....	42
-------------------------------------	----

Lista de figuras

Figura 1 – Fisiopatologia da SDRC-I.....	23
Figura 2 – Estágios do modelo de DPIC em camundongos.....	26
Figura 3 – Vias metabólicas e fontes dietéticas de ômega-3 e -6.....	28
Figura 4 – Vias metabólicas dos ácidos graxos ômega-3 e -6.....	29
Figura 5 – Delineamento experimental dos efeitos da suplementação preventiva de ômega-3 sobre ensaios comportamentais.....	37
Figura 6 - Delineamento experimental dos efeitos da suplementação preventiva de ômega-3 sobre parâmetros bioquímicos.....	38

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	16
2. INTRODUÇÃO.....	17
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1.1 Síndrome da dor regional complexa.....	19
2.1.1.1 Estado isquêmico e inflamatório na SDRC.....	21
2.1.1.2 O papel das citocinas pró-inflamatórias na hiperalgesia inflamatória.....	23
2.1.2 Modelos animais da SDRC.....	25
2.1.3 Ação anti-inflamatória do ômega-3.....	27
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. MÉTODOS.....	35
4.1 TIPO DE ESTUDO.....	35
4.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	35
4.3 ANIMAIS.....	35
4.4 DELINEAMENTO.....	36
4.5 TESTES.....	39
4.5.1 Testes comportamentais.....	39
4.5.1.1 Procedimentos para indução da SDRC-I.....	39
4.5.1.2 Tratamento com ômega-3.....	39
4.5.1.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	39
4.5.1.4 Teste de esquiva ao estímulo mecânico.....	40
4.5.1.5 Teste do campo aberto.....	40
4.5.2 Ensaios bioquímicos.....	41
4.5.2.1 Análise das concentrações de citocinas por meio de ensaio de imunoabsorção ligado a enzima.....	41
4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	42
4.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	42
4.7.1 Análise estatística.....	42
4.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	42
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	47

REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO.....	53
ANEXO A – Parecer Aprovação CEUA.....	53
ANEXO B – Produções e trabalhos desenvolvidos.....	55

1. APRESENTAÇÃO

As seções **INTRODUÇÃO, REFERENCIAL TEÓRICO, MÉTODOS E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** encontram-se no corpo dessa dissertação e representam a íntegra deste estudo. Os resultados e a discussão que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, os quais encontram-se no item **ARTIGO CIENTÍFICO**.

O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **MÉTODOS** desta dissertação.

2. INTRODUÇÃO

A síndrome da dor regional complexa do tipo I (SDRC-I) caracteriza-se como uma condição clínica incapacitante, que se apresenta de maneira crônica e responde de forma insatisfatória a uma variedade de tratamentos¹. Os indivíduos com essa síndrome apresentam sintomas sensoriais, anormalidades autonômicas e motoras, bem como sintomas inflamatórios. Pode se desenvolver em consequência de um trauma leve ou grave e aproximadamente 1% de todas as fraturas irá evoluir para SDRC-I, mostrando-se como complicação comum de fraturas de rádio distal (4-37% dos casos), em cirurgia do túnel do carpo (2-4% dos casos) ou cirurgia para correção da contratura de Dupuytren. Desenvolve-se também após qualquer tipo de lesão, desde quedas e entorses². Além disso, é marcada pela gravidade dos sintomas, o qual é desproporcionável à gravidade do trauma, com uma tendência a se dissipar no membro distal afetado³.

O mecanismo fisiopatológico da SDRC-I é controverso, porém evidências indicam a ocorrência de uma patogênese inflamatória com envolvimento do sistema nervoso simpático. A hipótese é de que um evento como um trauma sobre o membro desencadearia um processo inflamatório exacerbado, o qual excede o curso clínico e duração esperada. Os sintomas da SDRC-I incluem dor espontânea, inclusive frente à estímulos inócuos, caracterizando a alodinia mecânica, bem como hiperalgesia mecânica e térmica, e alodinia ao frio. Os pacientes apresentam também distúrbios vasomotores e sudomotores, assim como mudanças tróficas na pele, cabelos, unhas e ossos^{4,5}. Trata-se de uma forma relativamente rara de dor crônica, e seu tratamento envolve intervenções farmacológicas (antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, opioides, anti-inflamatórios, corticosteroides), fisioterapia, psicoterapia, inibição do sistema nervoso simpático, simpatectomia química e cirúrgica. Apesar da ampla variedade de intervenções empregadas atualmente, seu tratamento constitui-se um desafio para a área clínica e experimental, visto que a eficácia desses tratamentos não é satisfatória^{5,6}.

É bem descrito na literatura o papel dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) ômega-3, especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA), na prevenção e tratamento de distúrbios inflamatórios⁷. Dentre os mecanismos de ação propostos estão o desvio da síntese de eicosanoides à produtos não inflamatórios, bem como a produção de mediadores lipídicos anti-inflamatórios

(tais como: resolvinas, protectinas e maresinas), inibição da ativação do fator nuclear kappa κ B (NF κ B), entre outros. Apesar de comprovados os efeitos anti-inflamatórios dos ácidos graxos ômega-3, seus benefícios terapêuticos em diferentes tipos de dor ainda não foram demonstrados⁸.

Levando em consideração a resposta inflamatória e dor induzida pós isquemia crônica, assim como na SDRC-I e a capacidade anti-inflamatória do ômega-3, objetiva-se avaliar, por meio de testes comportamentais e bioquímicos, o potencial anti-inflamatório e anti-hiperalgésico da suplementação com ômega-3 em um modelo da SDRC-I em camundongos. Dentro desse contexto, considerando-se a propriedade anti-inflamatória do ômega-3, assim como os vários benefícios proporcionados aos indivíduos quando suplementado, após verificada a eficácia da suplementação, pode ser considerado um tratamento alternativo à condição clínica apresentada, não havendo efeitos colaterais como os apresentados pelos agentes terapêuticos convencionais. Neste sentido, esta pesquisa se justifica visto que entre os medicamentos empregados atualmente no tratamento da SDRC-I cita-se os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs). Apesar de essa classe de medicamentos ser frequentemente modificada a fim de diminuir os efeitos colaterais, sabe-se que ainda apresentam toxicidade gastrointestinal, além de produzir efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular. Entre os efeitos colaterais observa-se hipersensibilidade ao ácido acetilsalicílico, sangramento no trato gastrointestinal, dores, ulcerações e sangramento na parede intestinal, acometendo em média 35% dos usuários. Levando em consideração sua limitação em eficácia e segurança, faz-se necessário estudos a fim de desenvolver novos medicamentos anti-inflamatórios eficazes e que apresentem menos efeitos colaterais^{9,7}.

Com base no exposto acima, se postulou a seguinte pergunta: A suplementação de ômega-3 possui efeito anti-inflamatório e anti-hiperalgésico sobre um modelo animal da SDRC-I?

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1 Síndrome da dor regional complexa

A SDRC é a denominação dada a uma síndrome relatada pela primeira vez no século XVII. Foram utilizados diferentes nomes para descrevê-la como causalgia, algodistrofia, distrofia simpática reflexo, síndrome do ombro à mão e síndrome de Sudeck¹⁰. O nome atual SDRC foi definido de acordo com seus sintomas, sendo que apresenta manifestações clínicas autonômicas, regional visto que geralmente envolve apenas um membro ou extremidade, onde a dor pode ser evocada ou espontânea e denomina-se síndrome devido a presença de diversos eventos relacionados ao estágio em que se encontra o indivíduo¹¹. Caracteriza-se por uma variedade de condições dolorosas, desencadeadas por uma lesão, a qual se manifesta regionalmente com predominância distal, excedendo em magnitude e duração o curso clínico esperado da lesão inicial. Causa ainda um comprometimento da função motora, mostrando progressão variável de acordo com o tempo^{12,13}.

A SDRC apresenta-se de duas formas. Denomina-se SDRC-I quando há disfunção nervosa, porém com ausência de lesão nervosa instalada, e síndrome da dor regional complexa tipo II quando a lesão nervosa está presente com sinais e sintomas clínicos característicos do trauma e/ou lesão inicial^{14,15}. Em ambas encontra-se dor espontânea ou alodinia, hiperalgesia, edema, fluxo sanguíneo e atividade sudomotora anormal, sendo que tais sintomas não limitam-se apenas à região/local da lesão ou nervo lesionado¹¹.

Com relação à epidemiologia, é mais frequente em mulheres do que em homens em uma relação entre 3:1 sendo a idade média de 40 anos. Além disso, também é encontrada em crianças e adolescentes com diagnóstico na média de idade de 11,8 anos. A incidência da SDRC-I é difícil de ser avaliada, mas é estimada após uma fratura em 1-2% e cerca de 19% dos casos ocorre no período pós-operatório de cirurgias. Também há relatos de casos de SDRC-I desenvolvidos pós processos inflamatórios locais e procedimentos minimamente invasivos (infiltrações em tecidos moles ou punções venosas)^{16,17}.

Em estudo com Coreanos estimou-se sua incidência em 5-25 por 100.000 pessoas por ano, afetando principalmente membros inferiores e sexo feminino, na média de idade entre 40 e 60 anos. Já em outro estudo com holandeses a incidência

foi estimada em 26 por 100.000 habitantes por ano, onde mulheres são afetadas três vezes mais do que homens^{18,19}.

O diagnóstico preciso da SDRC-I é um desafio para os profissionais da área da saúde visto que não há um exame ou teste específico, objetivo e definitivo para confirmar o diagnóstico clínico. Sendo assim, seu diagnóstico deve associar anamnese e exame clínico detalhado, eliminando por meio do diagnóstico diferencial diversas doenças neurológicas, vasculares, inflamatórias, musculoesqueléticas ou de origem psicológica. Em 2010 foram determinados e validados critérios diagnósticos para auxiliar no diagnóstico dessa condição, denominados Critérios de Budapeste (Quadro 1). Estes são aplicados quando: i) os sintomas estão relacionados à um trauma em um membro; ii) os sintomas não podem ser explicados mais pelo trauma; iii) afetam tecidos e inervações que não do local do trauma inicial; iv) outras doenças são vigorosamente excluídas⁵.

Quadro 1 – Critérios Modificados de Budapeste

1. Dor contínua, desproporcional à lesão inicial.	
2. Apresentar pelo menos um sintoma em três das seguintes categorias:	
Sintomas sensoriais	Hiperestesia e/ou alodinia
Sintomas vasomotores	Assimetria de temperatura e/ou assimetria/alterações na coloração da pele
Sintomas sudomotores	Edema e alterações da sudorese
Sintomas motores/tróficos	Diminuição da amplitude do movimento e/ou disfunção motora, alterações tróficas
3. Apresentar pelo menos um sinal durante avaliação em duas ou mais das seguintes categorias:	
Sintomas sensoriais	Evidência de hiperestesia e/ou alodinia ao toque, temperatura ou pressão
Sintomas vasomotores	Evidência de assimetria de temperatura (>1°C) e/ou assimetria na coloração da pele
Sintomas sudomotores	Edema e alterações da sudorese
Sintomas motores/tróficos	Diminuição da amplitude do movimento e/ou disfunção motora, alterações tróficas
4. Não exista outro diagnóstico que possuam os mesmos sinais e sintomas.	

Fonte: Lee, Lee e Choy, 2018⁵.

Entre os principais sintomas e manifestações clínicas da SDRC-I encontram-se dor regional, alodinia, hiperalgesia, edema, alterações na cor e temperatura da pele, assim como diminuição da amplitude de movimento ou disfunção motora¹⁴. A progressão ocorre por uma fase inflamatória aguda (primeiros três meses), seguida por alterações tróficas (entre terceiro e sexto mês) e por fim, hipotrofia (sexto mês). A duração das fases citadas é variável, sendo que os estágios e sintomas não acontecem necessariamente nessa sequência, sendo a SDRC-I caracterizada como dor inflamatória em estágio agudo e dor neuropática no estágio crônico^{20,21}.

2.1.1.1 Estado isquêmico e inflamatório na SDRC

Após um estímulo nocivo de natureza química ou física, um processo inflamatório é desencadeado como resposta a lesão. Na fase inicial apresenta manifestações clínicas como calor, rubor, edema e dor, posteriormente rigidez articular²².

A inflamação consiste em uma resposta do organismo a danos celulares e/ou teciduais como consequência de infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química ou física, caracterizando-se por vasodilatação frente à liberação de mediadores químicos e recrutamento de leucócitos para o local da inflamação. O processo inflamatório constitui-se como fundamental para a sobrevivência do organismo afetado por um insulto, visto que ele visa à eliminação de patógenos e consequente manutenção da homeostase do organismo, assim como reestruturação do tecido lesionado, porém uma resposta inflamatória desregulada acaba prejudicando o próprio organismo^{22, 23}.

A intensidade da isquemia dependerá do nível de oclusão do vaso sanguíneo, da circulação colateral e do grau de demanda de oxigênio dos tecidos envolvidos. O tempo de isquemia também é um fator importante na determinação da intensidade das lesões, sendo que o tecido muscular possui resistência intermediária à isquemia, os nervos caracterizam-se como os tecidos mais sensíveis e os tendões, ossos e pele como os mais resistentes à essa condição. Apesar dos danos teciduais causados pela isquemia, sabe-se que a reperfusão é caracterizada como principal causa de lesão tecidual como consequência da intensa produção de EROs^{24,25}.

O edema regional significativo caracteriza o início da SDRC-I. O plasma extravasado se acumula no interstício aumentando a pressão dentro de um espaço

anatômico relativamente pequeno, ocluindo os capilares dos tecidos adjacentes e provocando uma síndrome compartimental (figura 1)^{26,27}. Os tecidos isquêmicos provenientes dessa lesão acumulam enzimas oxidativas e após a reperfusão, as oxidases acumuladas reduzem o retorno de oxigênio molecular e as células dos microvasos ficam expostas a altos níveis de EROs que danificam o endotélio vascular^{28,29}.

A hipótese de fisiopatologia da SDRC-I consiste em edema, decorrente da lesão de tecidos profundos, que causa uma síndrome do tipo compartimental. Tal síndrome causa lesão microvascular, essa como consequência da IR (causada pela interrupção do fluxo sanguíneo ao nervo, músculo e osso na região acometida) e processo inflamatório, assim como ocorre lesão de células endoteliais pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Os processos mencionados desencadeiam vasoespasmo e um fluxo lento/interrupção temporária do refluxo nas porções microvasculares de tecidos profundos, conseqüentemente ocorre a isquemia seguida de reperfusão. Por sua vez, tal processo desencadeia a inflamação, ativando e sensibilizando os nociceptores no músculo e ossos. Já no nervo, o processo de isquemia e reperfusão causa descargas ectópicas nos nociceptores⁴.

Também há um aumento dos mediadores inflamatórios sistêmicos, mostrando que a SDRC-I apresenta uma resposta inflamatória local exacerbada devido à lesão. As anormalidades neurológicas (amplificação da percepção dolorosa, disfunções vasomotoras) são provenientes de danos em diversas estruturas, inclusive no nervo, bem como da sensibilização central decorrente do processo inflamatório instalado^{13,22}.

A isquemia crônica, assim como o processo de reperfusão é marcado também por resposta inflamatória. As células endoteliais danificadas pelas EROs liberam vários mediadores pró-inflamatórios, assim como citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), a qual possui efeito citotóxico direto no endotélio, e que estimula a produção de outras citocinas, como as interleucinas, as quais promovem a ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos que, por sua vez, liberam ânions superóxido e outras EROs que participam no processo de lesão do tecido endotelial. A interleucina-1 (IL-1) está relacionada à ativação de neutrófilos e induz à expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e no endotélio. Além disso, elas induzem o aumento da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e a expressão da

enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A interleucina-6 (IL-6) têm sua produção estimulada a partir da liberação de IL-1 β e TNF- α ³⁰.

Diante da fisiopatologia em questão, as etapas que sucedem o processo de isquemia reperfusão, assim como resolução do processo inflamatório são alvos de estudos visando terapias efetivas, visto que são de extrema importância para a manutenção das manifestações clínicas e progressão da SDRC-I.

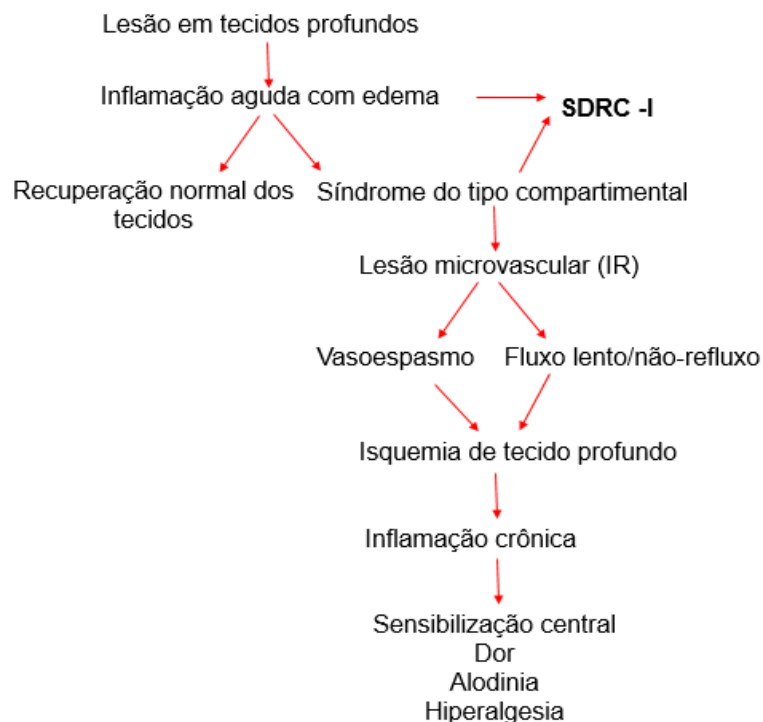


Figura 1 – Fisiopatologia da SDRC-I

Fonte: Adaptado de Coderre e Bennett (2010)⁴.

Legenda: Etapas da fisiopatologia da SDRC, onde a síndrome do tipo compartimental leva a lesão microvascular, causando IR, ocasionando inflamação crônica, que desencadeará sensibilização central. SDRC-I: Síndrome da dor regional complexa – I; IR: isquemia e reperfusão.

2.1.1.2 O papel das citocinas pró-inflamatórias na hiperalgisia inflamatória

Em quadros clínicos de dor crônica, a hiperalgisia consiste no aumento da resposta à estímulos nocivos térmicos e mecânicos. Ocorre como decorrência da sensibilização dos nociceptores presentes nos terminais dos neurônios nociceptivos periféricos (sensibilização periférica), fenômeno que está associado ao aumento da

responsividade de neurônios do corno posterior da medula espinal (neurônios nociceptivos centrais), ocorrendo então a sensibilização central. Também pode se desenvolver quadros de alodinia, a qual caracteriza-se por resposta dolorosa frente à estímulos inócuos³¹.

Durante o processo inflamatório, células residentes como células dendríticas, macrófagos, linfócitos e mastócitos, após reconhecer os estímulos inflamatórios, liberam uma cascata de citocinas, as quais desempenham papel fundamental no desenvolvimento da dor inflamatória, assim como desencadeiam outros eventos inflamatórios, que garantem a continuidade do processo. As primeiras citocinas descritas a participarem no desenvolvimento da dor inflamatória são o TNF, IL-1 β , IL-6³².

O TNF é uma importante citocina pró-inflamatória produzida por diferentes tipos de células, incluindo células imunes, neuronais e gliais. Em resposta à lesão ou inflamação, o TNF serve como um gatilho para ativação de outras citocinas e fatores de crescimento. Além disso, desempenha papel importante no desenvolvimento e manutenção da dor inflamatória e neuropática³³.

O mecanismo no qual o TNF induz sensibilização dos neurônios nociceptivos periféricos parece ser pelo aumento da sensibilidade e/ou expressão de canais iônicos que participam da transdução de estímulos mecânicos e térmicos (por exemplo, TRPV), e/ou por meio do aumento da sensibilidade de canais iônicos dependentes de voltagem envolvidos na excitabilidade geral de neurônios sensoriais da geração de potenciais de ação. O canal iônico TRPV1 é aberto por estímulo térmico ao calor e o influxo de íons converte o estímulo térmico em potencial elétrico. Quando o TRPV1 é sensibilizado, sua abertura é realizada frente a temperaturas mais baixas que o limiar normal, sendo esta queda essencial para a geração de hiperalgesia térmica³³.

Durante o processo inflamatório, a IL-1 β é produzida por diferentes tipos de células, como macrófagos, monócitos e células gliais, e induz a produção de outros mediadores inflamatórios. Além disso, está envolvida em várias características do processo, como o recrutamento de células do sistema imunológico, aumento da temperatura, liberação proteica da fase aguda e edema³².

A IL-1 β estimula a expressão da enzima COX-2 e a subsequente liberação de dos produtos de sua ação, como as prostaglandinas. O fato das prostaglandinas sensibilizarem os nociceptores, sugere o papel dessa essa citocina como um

importante mediador inflamatório hiperalgésico. Dessa forma, há uma grande quantidade de dados na literatura que sugerem o papel da IL-1 β como um mediador hipernociceptivo intermediário, principalmente nos tecidos periféricos. Na perspectiva terapêutica, os dados experimentais mostram que a inibição da produção da citocina em questão faz-se um alvo para controlar a dor inflamatória³².

2.1.2 Modelos animais da SDRC

Um modelo animal translacional para a SDRC mostra-se extremamente necessário, visto que a fisiopatologia desta condição permanece indefinida, assim como os tratamentos existentes ineficazes. Sabe-se que os modelos animais apresentam limitações quanto à mimetização dos sinais e sintomas da condição em humanos, porém possibilita analisar alterações nociceptivas, inflamatórias e tróficas após a lesão, proporcionando o avanço da investigação da fisiopatologia, assim como a identificação de tratamentos mais seguros e eficazes³⁴.

Entre os modelos animais existentes da SDRC estão: lesão do nervo periférico, lesão por isquemia e reperfusão (IR), trauma e imobilização (causas cirúrgicas e traumáticas) dos membros, e apesar de apresentarem e simularem características semelhantes a síndrome em casos clínicos, como qualquer modelo animal, nenhum dos citados apresenta com exatidão os quadros apresentados em humanos³⁴.

O modelo de dor pós isquemia crônica (DPIC) é utilizado para indução da SDRC-I. A metodologia experimental consiste na inserção de um anel elástico (torniquete) apertado sobre o tornozelo da pata posterior direita durante 3 horas. Após a retirada, ocorre a reperfusão com sintomas inflamatórios unilateral (calor e edema), assim como alodinia bilateral e hiperalgesia mecânica e ao frio. Caracteriza-se também por resposta inflamatória, visto que há infiltração de macrófagos e neutrófilos no membro afetado, havendo ainda aumento nas concentrações de citocinas e produtos resultantes de estresse oxidativo na pele e músculo da pata. Afirma-se que o modelo em questão mimetiza a fisiopatologia de indivíduos com a SDRC-I com membro lesionado pelo frio, apresentando vasoconstrição microvascular aumentada, hipóxia tecidual e acidose tecidual metabólica, gerando radicais livres que acabam por lesar o endotélio vascular do membro afetado, contribuindo assim para perpetuação da sensibilização nociceptiva. A hipótese fisiopatológica do modelo da DPIC está

baseada no fato de que, após a liberação do torniquete, há edema extenso, seguido de uma síndrome compartimental. Tal síndrome também pode ocorrer em seres humanos, quando expostos à torniquetes excessivos^{34,35}.

No modelo de DPIC após a reperfusão, há um período de hiperemia e vasodilatação, onde a pata traseira mostra aumento da temperatura e edema intenso, permanecendo assim por um período de 4 horas. 24 horas após a reperfusão, a hiperemia e edema desaparecem e a pata traseira desenvolve as alterações tróficas características (aparência seca e brilhante). Neste modelo, o desenvolvimento de edema é significativamente elevado 2 horas após a retirada do torniquete e permanece até 12 horas após a reperfusão. A alodinia e hiperalgesia mecânica são desenvolvidas 8 horas após a retirada do torniquete e permanecem até 2 semanas após a reperfusão, sendo encontradas na pata ipsilateral e controlateral³⁵ (Figura 2).



Figura 2 – Estágios do modelo de DPIC em camundongos.

Fonte: Bratti (2012)³⁶

Legenda: A: pata saudável, antes da exposição ao torniquete; B: durante a isquemia, causando hipóxia tecidual, pata apresenta redução da temperatura e cianose; C: cinco minutos após a reperfusão, durante hiperemia intensa, a pata apresenta-se ingurgitada com sangue e edematosa; D: quatro dias após a reperfusão, onde a hiperemia e edema ainda estão presentes e a pata mostra-se ressecada.

O modelo animal de lesão do nervo periférico é utilizado para indução da SDRC do tipo II e para sua indução, ocorre a exposição e lesão do nervo isquiático. Os animais desenvolvem resposta inflamatória menos expressiva quando comparado

ao modelo animal de IR, porém apresentam sintomas, como hiperalgesia mecânica. Entre os modelos mais utilizados, cita-se também o modelo de fratura da tíbia, onde os animais desenvolvem, três a quatro semanas pós indução, aumento na temperatura da pata ipsilateral, edema, alodinia, diminuição do peso da pata e osteoporose periarticular³⁴.

2.1.3 Ação anti-inflamatória do Ômega-3

Os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 são um grupo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs, Figura 3), os quais desempenham funções importantes na estrutura e fluidez da membrana, bem como sinalização celular. A diferenciação entre ômega-3 e ômega-6 é estrutural e funcional, sendo que a designação refere-se à ligação dupla no terceiro ou sexto carbono do grupo metil, respectivamente³⁷.

O ômega-3 é denominado um AGPI essencial pois não é sintetizado pelo corpo humano, sendo necessário sua ingestão via dieta, mediante consumo de peixes gordurosos de águas frias, frutos do mar ou suplementação. Após a ingestão, o metabolismo realiza a conversão do ômega-3 em EPA e ácido docosahexaenoico (DHA) (Figura 4).

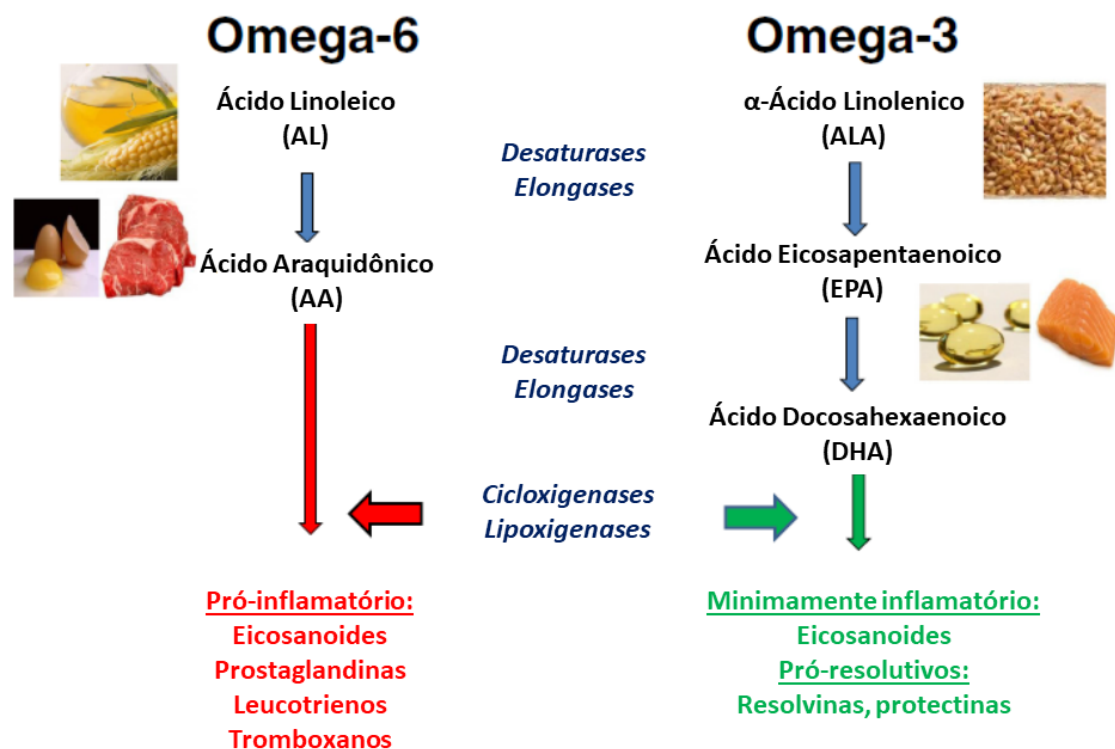


Figura 3 – Vias metabólicas e fontes dietéticas de ômega-3 e ômega-6

Fonte: Adaptado de Fabian, Kimler e Hursting (2015)³⁷

Legenda: Fontes dietéticas e vias metabólicas dos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, resultando na produção de mediadores pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios. AA: ácido araquidônico; ALA: ácido alfa linolênico; DHA: ácido decosahexaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico; LA: ácido linoleico.

O ômega-3, mais especificamente, EPA e DHA são importantes para o desenvolvimento da retina e cérebro, tendo grande influência no controle dos níveis de colesterol sanguíneo, função cognitiva, assim como prevenção de diversas doenças (depressão, acidente vascular cerebral e Alzheimer). Além disso, possuem importante propriedade anti-inflamatória, devido a produção de mediadores pró resolutivos inflamatórios, denominados resolvinas, maresinas e protectinas^{37,7,38}.

Sabe-se que a resolução da inflamação aguda é um processo ativo e que as protectinas, maresinas e resolvinas desempenham um papel importante na resolução da inflamação, e apesar dos mecanismos pelo qual tal resolução ocorrem não estarem totalmente elucidados, sabe-se que tais metabólitos realizam a regulação da resposta inflamatória e resposta do hospedeiro à lesão, assim como auxiliam na regulação de processos infecciosos^{39,40}.

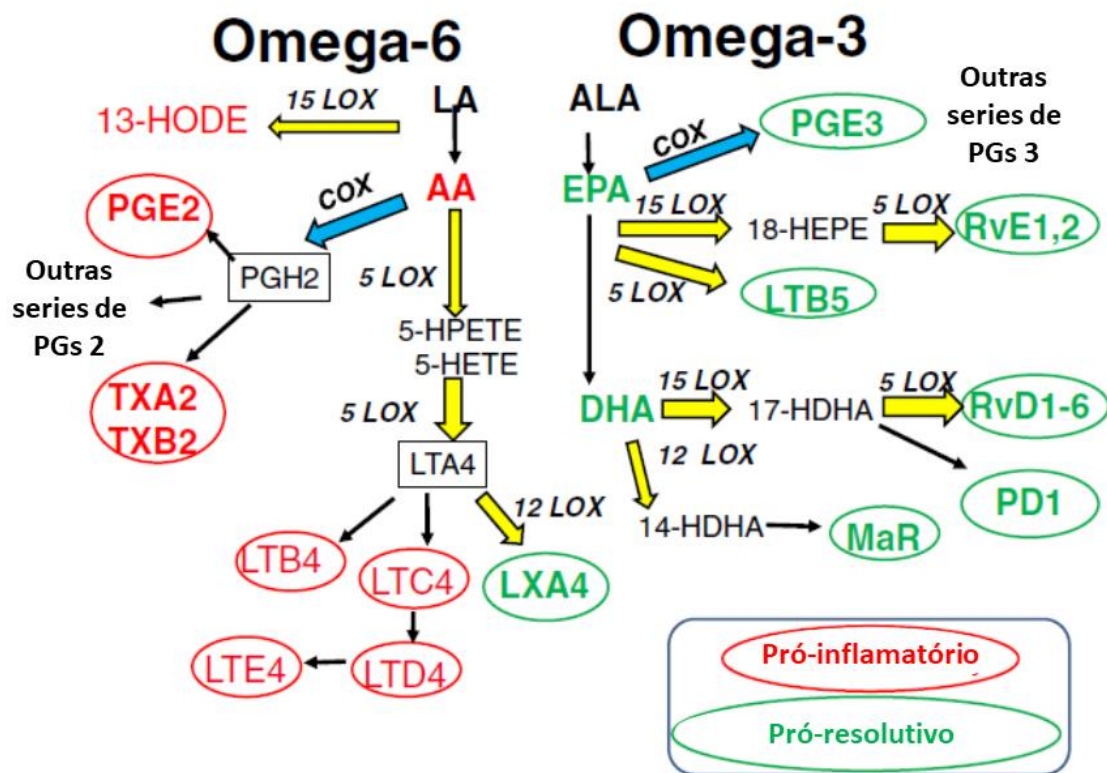


Figura 4 – Vias metabólicas dos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6

Fonte: Adaptado de Fabian, Kimler e Hursting (2015)³⁷

Legenda: Vias metabólicas dos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 que resultarão na produção de mediadores pró-inflamatórios (vermelhos) ou pró-resolutivos (verdes). Os processos enzimáticos provenientes via ciclooxigenase são representados pela cor azul, e a via da lipoxigenase pela cor amarela. AA: ácido araquidônico; ALA: ácido alfa linolênico; COX: ciclooxigenase; DHA: ácido decosahexaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico; HDHA: ácido hidroxidocosahexaenoico; HEPE: ácido hidroxieicosapentaenoico; HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; HODE: ácido hidroxioctadecadienoico; HPETE: ácido hidroperoxieicosatetraenoico; LA: ácido linoleico; LOX: lipoxigenase; LT: leucotrieno; LX: lipoxinas; HX: hepoxilina; MaR: maresina; PD1: protectinas D1; PG: prostaglandina; Rv: resolvina; TX: tromboxano.

Um dos mecanismos de ação pelo qual o ômega-3 produz seu efeito anti-inflamatório é por meio da cascata do ácido araquidônico (AA) (ômega-6). Após a ocorrência de um estímulo inflamatório, ocorre a liberação de AA das membranas fosfolipídicas mediante ação da enzima fosfolipase A2, bem como atração de monócitos e produção de metabólitos pró-inflamatórios. A partir da liberação de AA, as enzimas COX-1 e COX-2 produzem prostaglandinas da série E2 e tromboxanos. Já as enzimas lipoxigenases (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX) são responsáveis pela geração dos leucotrienos e lipoxinas da série quatro (Figura 2)³⁷.

No metabolismo dos ácidos graxos ômega-3, as enzimas COX e LOX possuem a função de produzir eicosanóides com menor afinidade pelos seus receptores, assim como produção das resolvinas, as quais bloqueiam o recrutamento de células inflamatórias e promovem a fagocitose. Mais especificamente, a ação da COX no EPA origina prostaglandinas da série três e tromboxanos, enquanto que as ações da 5-LOX e 15-LOX produz leucotrienos da série 5 e resolvinas. De maneira geral, as enzimas LOX estão envolvidas na produção de resolvinas derivadas também do DHA e eventualmente, na produção de neuroprotectinas. Dessa forma, a presença de ômega-3, e consequentemente EPA e DHA, em quantidades suficientes em relação ao AA, resulta em papel anti-inflamatório (Figura 2)³⁷.

Os eicosanoides (prostaglandina E₂), produzidos a partir da cascata do AA, induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias. Com o aumento da ingestão de ômega-3 ocorre uma diminuição da quantidade de AA disponível para a síntese de eicosanoides, visto que os AGPIs da família ômega-3 e 6 são competitivamente metabolizados. Além disso, após a ingestão de ômega-3, EPA e DHA entram na corrente sanguínea de forma relativamente rápida, são incorporadas na membrana celular de fosfolipídios e inibem a ativação dos principais fatores de transcrição, como o NFκB, o qual aumenta a expressão de genes que produzem as citocinas pró-inflamatórias pelas células envolvidas no processo inflamatório⁴¹. Apesar da sua ação em antagonizar o metabolismo do AA possuir importante atividade anti-inflamatória, os ácido graxos ômega-3 podem inibir a produção de IL-1 e TNF-α por monócitos, assim como inibir a produção de IL-6 e interleucina-8 (IL-8) por células endoteliais⁴².

As resolvinas são biossintetizadas endogenamente durante a resolução da inflamação e alguns subtipos (RvE1, RvE2, RvE3) deste metabólito causam a inibição da migração de leucócitos e neutrófilos, assim como aumento da atividade fagocítica dos macrófagos, acarretando na limpeza dos tecidos e retorno da homeostase tecidual⁴⁰.

Na manutenção da homeostase, assim como em doenças e processos inflamatórios, os macrófagos possuem grande influência, sendo que sua ação pró ou anti-inflamatória está diretamente relacionada ao fenótipo que adotam após ativação. Os macrófagos classicamente ativados (M1) produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF, entre outras) e os macrófagos alternativamente ativados (M2) participam da secreção de citocinas anti-inflamatórias (interleucina-4 e interleucina-10) e reparo

de tecidos. Estudos demonstram que resolvinas D1, maresinas D1, bem como seu precursor DHA possuem grande potencial na modulação do fenótipo dos macrófagos. Além disso, há evidências de que quando níveis elevados de ômega-3 estão presentes, concomitantemente a estímulos inflamatórios clássicos, os macrófagos M1 presentes, secretam quantidades menores de IL-6, TNF- α e IL-1 β ^{24,43}.

O óleo de peixe, principal fonte de EPA e DHA, têm demonstrado propriedades analgésica e anti-inflamatória em modelos animais de dor crônica. Os estudos experimentais atribuíram aos AGPIs ômega-3, modulação da atividade neuronal, regulação da resposta de células imunes, assim como a produção de mediadores lipídicos anti-inflamatórios, acarretando em potente resposta pró-resolutiva³⁸.

Têm aumentado o número de evidências sugerindo que a neuroinflamação, caracterizada por ativação de células gliais e geração de citocinas pró inflamatórias no sistema nervoso periférico e central, desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção da dor crônica. Os mediadores lipídicos pró resolutivos derivados do ômega-3 controlam a neuroinflamação por meio da inibição da ativação glial e liberação de TNF- α e IL-1 β pelas células gliais⁴⁴.

Recentemente, uma ampla quantidade de estudos tem demonstrado que a ingestão crônica de AGPIs ômega-3 está associada a uma redução da dor em pacientes portadores de artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais e dismenorreia. Além disso, ratos tratados com uma alta proporção de n-6/n-3 dietético apresentam um limiar acentuadamente aumentado para nocicepção térmica e dor neuropática, bem como forte efeito nociceptivo em modelos animais de nocicepção química. A partir desses achados, comprova-se que os AGPIs n-3 constituem-se como fatores mediadores no processamento da dor^{45,46}.

Apesar dos mecanismos pelos quais as resolvinas atuam na modulação da dor e inflamação não estarem completamente elucidados, muitos estudos comprovam suas propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva. Os efeitos analgésicos das resolvinas também são mediados por receptores acoplados à proteína G, como o receptor para resolvina E1 (receptor para quimerina R23) e receptor para resolvina D1 (receptor acoplado à proteína G 32), os quais são amplamente expressos por células imunes, gliais e neurônios. Dessa forma, as resolvinas atenuam a dor anormal através de múltiplos mecanismos agindo sobre vários tipos de células, reduzindo o processo

inflamatório, ativação glial e plasticidade sináptica da medula espinal. Além disso, as resolvinas também atuam por meio da inibição da via NF- κ B diminuindo a síntese de mediadores pró inflamatórios⁴⁷.

A família dos genes receptores para peptídeos formilados (FPR, do inglês, *formyl peptide receptor*) possui três membros identificados: FPR1, FPR2 e FPR3, os quais codificam receptores distintos e regulam naturalmente respostas inflamatórias. Constituem-se como primeira linha de defesa contra infecção e inflamação, onde têm sido estudadas e investigadas sua relação com recrutamento e ativação de leucócitos. A ativação do receptor FPR2/ALX pode resultar em potentes respostas pró ou anti-inflamatórias, dependendo do tipo e concentração do ligante, tipo de ligação e circunstâncias. Estes receptores estão presentes em células fagocitárias, células endoteliais, células epiteliais, células da micróglia, glândulas salivares, córneas, baço e pulmão^{48,49}.

Estudos demonstram que a resolvina D1 exerce sua propriedade anti-inflamatória interagindo com o receptor FPR2/ALX. A interação da RvD1 com o FPR2/ALX parece produzir efeito pró-resolutivo por meio do controle da liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 em macrófagos humanos, assim como redução da migração de leucócitos e polimorfonucleados durante o processo inflamatório. Além disso, a propriedade analgésica das resolvinas também é atribuída em partes à sua capacidade de inibir as ações dos canais iônicos de potencial transiente (TRP), como TRPV1 e TRPA1, os quais têm sido fortemente implicados na gênese da dor inflamatória^{47,50,51}.

Apesar da potente ação analgésica das resolvinas, as mesmas não interferem no limiar de ativação da via nociceptiva. Dessa forma, injeção intraplantar, intratecal ou sistêmica das resolvinas não afeta a sensibilidade térmica ou mecânica em estudos experimentais. Em contraste, os analgésicos clássicos como morfina, diminuem drasticamente a sensibilidade fisiológica à estímulos dolorosos. Portanto, as resolvinas podem servir como uma nova classe de analgésicos que atuam para bloquear a dor sem alterar a sensibilidade normal, não apresentando os efeitos colaterais citados dos analgésicos clássicos⁴⁷.

Visto que a SDRC-I se trata de uma condição clínica incapacitante e que, apesar de já bem descrita na literatura, não possui um tratamento efetivo, sendo atualmente tratada com diversos medicamentos inespecíficos e que apresentam uma

grande quantidade de efeitos adversos, o presente estudo mostra-se relevante em abordar uma intervenção diferente no tratamento dessa condição dolorosa. Nesse estudo foram avaliadas as propriedades anti-inflamatória e anti-hiperalgésica do ômega-3 em um modelo animal de SDRC-I por meio dos ensaios bioquímicos e comportamentais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial anti-inflamatório e anti-hiperalgésico da suplementação de ômega-3 em um modelo animal de SDRC-I em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar em camundongos submetidos à IR da pata:

- O efeito da suplementação de ômega-3 sobre a hiperalgesia mecânica;
- O efeito da suplementação de ômega-3 sobre a capacidade cognitiva relacionada à dor;
- O efeito da suplementação de ômega-3 sobre a locomoção espontânea;
- O efeito da suplementação de ômega-3 sobre as concentrações de citocinas pró-inflamatórias na pata e medula espinal.

4. MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

A presente pesquisa possui natureza experimental e utilizou um modelo pré-clínico, caracterizando-se como uma pesquisa básica⁵².

4.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Foram utilizados: cetamina (Vetnil, São Paulo, Brasil), xilazina (Ceva, São Paulo, Brasil), fish oil 1000 mg (Natural Quanta, FL, EUA), fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, Tween 20 0,05%, BSA (1%, 5%), kits de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Os equipamentos utilizados para os procedimentos de IR foram: balança de alta precisão (Shimadzu Corporation, Japão), anéis elásticos (Elástico Ligadura 000-1237), monofilamento de von Frey (0,6 g) (VFH, Stoelting, IL, EUA), aparato de esquiva ao estímulo mecânico (Alumecril, Florianópolis, Brasil) programa Image Lab (versão 4.1; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), leitor de placas de ELISA (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China), centrífuga refrigerada SL701 (Marca Solab).

4.3 ANIMAIS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurociências Experimental (LANEX) – Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, obtidos do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pesando entre 30-40 gramas, com aproximadamente 2 meses de vida. Foram aclimatados a 22±2°C, ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a ração e água. Os animais foram aclimatados no laboratório 1 hora antes dos experimentos e usados somente uma vez em cada experimento. A seleção de animais foi realizada durante a coleta de dados basais, onde foram excluídos os animais que apresentaram frequência de resposta acima de 20% na avaliação da hiperalgesia mecânica (von Frey). Esta pesquisa foi encaminhada e aprovada pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UNISUL sob protocolo nº 18.050.4.01.IV. Todos os experimentos foram realizados de

acordo com o Guia de Cuidados de Animais de Laboratório e Guia ético para Investigações Experimentais da dor em animais conscientes⁵³.

4.4 DELINEAMENTO

O delineamento experimental, bem como testes e cronogramas de avaliações, citocinas a serem dosadas, duração do experimento, tempo e dose de suplementação, foram definidos de acordo com a literatura.

Este estudo foi composto por 2 etapas. Na primeira etapa foram realizados experimentos para determinar os efeitos da suplementação preventiva de ômega-3 sobre a avaliação da hiperalgesia mecânica, bem como avaliação da locomoção espontânea e capacidade cognitiva relacionada à dor dos camundongos submetidos ao procedimento de IR, caracterizando os efeitos funcionais (comportamentais) do óleo de peixe. Nesta etapa foram utilizados os grupos e os respectivos procedimentos descritos no quadro 2.

Quadro 2 – Os efeitos da suplementação preventiva com ômega-3 sobre testes comportamentais.

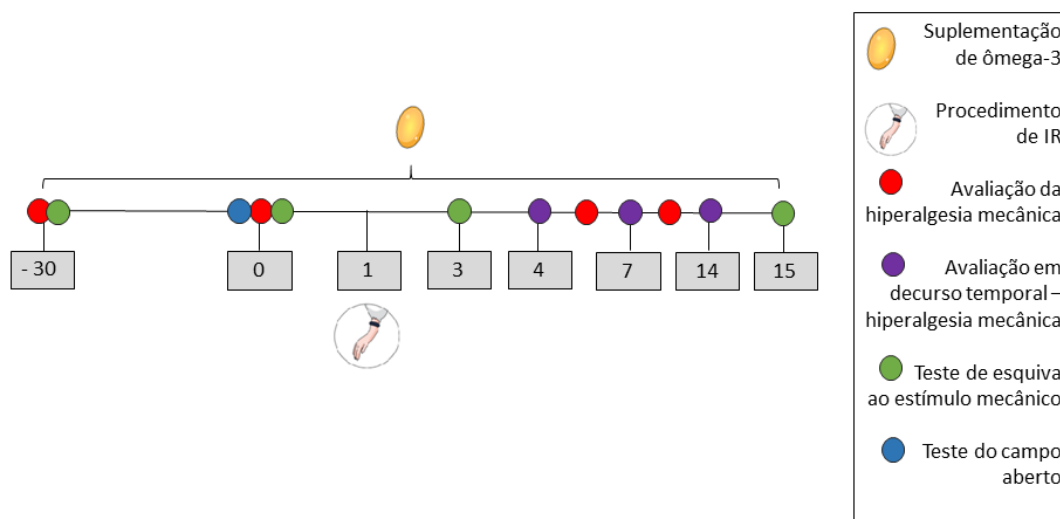
Grupos	N	Procedimento	Tratamentos
Grupo 1	<i>n</i> = 11	Falso	Salina (50 µl/animal/i.g.)
Grupo 2	<i>n</i> = 11	IR	Salina (50 µl/animal/i.g.)
Grupo 3	<i>n</i> = 11	IR	Óleo de milho (1,5 g/kg, i.g.)
Grupo 4	<i>n</i> = 11	IR	Ômega-3 (1,5 g/kg, i.g.)

Todos os grupos de animais do experimento receberam os respectivos tratamentos diariamente durante 30 dias antecedentes à indução do modelo de SDRC-I. As avaliações da hiperalgesia mecânica foram realizadas no primeiro dia de suplementação para coleta de dados basais. Após o procedimento de IR, todos os animais foram suplementados durante 14 dias e avaliados diariamente a partir do 4º dia, sendo que as avaliações em decurso temporal do efeito do ômega-3 ocorreram no 4º, 7º e 14º dia pós DPIC.

O teste do campo aberto para avaliação da locomoção espontânea dos animais ocorreu no 30º dia de suplementação, antes da indução do modelo de SDRC-I a fim de verificar se a suplementação crônica de ômega-3 apresenta efeito sedativo.

Já o teste de esquiva ao estímulo mecânico foi realizado no início do experimento, a fim de coleta de dados basais, após 30 dias de suplementação e no 3° e 15° após IR.

Figura 5 – Delineamento experimental dos efeitos da suplementação preventiva de ômega-3 sobre ensaios comportamentais.



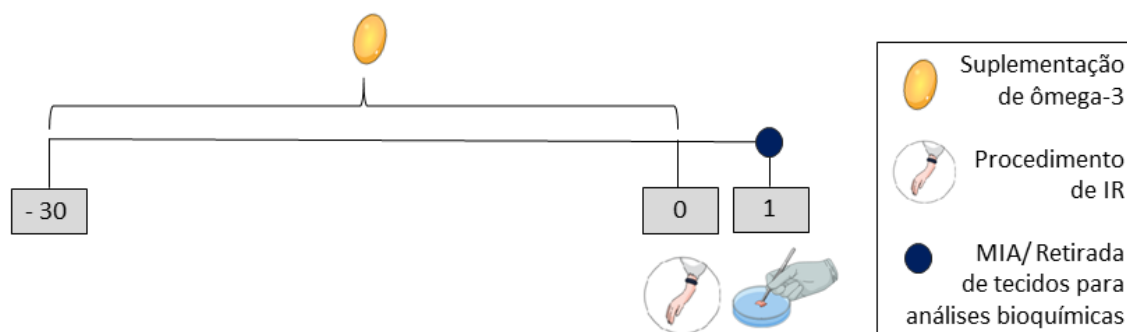
A segunda etapa do experimento foi realizada a fim de determinar os efeitos da suplementação preventiva de ômega-3 sobre parâmetro bioquímicos do processo inflamatório. Foram mensuradas as concentrações das citocinas TNF e IL-1 β na medula espinal e músculo da pata dos camundongos. Nesta etapa foram utilizados os grupos e os respectivos procedimentos descritos no quadro 3.

Quadro 3 - Os efeitos da suplementação preventiva com ômega-3 sobre parâmetros bioquímicos.

Grupos	N	Procedimento	Tratamentos
Grupo 1	$n = 11$	Falso	Salina (50 μ l/i.g.)
Grupo 2	$n = 11$	IR	Salina (50 μ l/i.g.)
Grupo 3	$n = 11$	IR	Óleo de milho (1,5 g/kg, i.g.)
Grupo 4	$n = 11$	IR	Ômega-3 (1,5 g/kg, i.g.)

Os animais desse experimento foram tratados diariamente com ômega-3 ou veículo durante 30 dias antes da indução do modelo de SDRG-I. A morte indolor assistida (MIA) dos animais ocorreu 24 horas após o procedimento de IR (figura 6). As amostras retiradas foram colocadas em tubos ependorfes e armazenadas em freezer -80°C.

Figura 6 – Delineamento experimental dos efeitos da suplementação preventiva de ômega-3 sobre parâmetros bioquímicos.



O número de animais por grupo foi definido de acordo com a equação para a determinação de uma amostra sem reposição⁵⁴. Para tal, foi utilizada a fórmula: $n = (((z \text{ alfa} + z \text{ beta}) * s) / \text{sigma})^2$. Sendo que, o valor de alfa foi fixado em 0,05 e o valor de z alfa baseado na tabela de valores de z para distribuição bi-caudal de 1,96. O valor de beta foi determinado em 0,10 e o valor de z beta baseado na tabela de valor de z para distribuição unicaudal de 1,28.

Foi estabelecido o mínimo de 40% como valor de diferença entre as médias dos grupos, baseado em dados experimentais do LaNEx. Levou-se em consideração ainda que experimentos biológicos possuem margem de erro entre 10 a 15% procedentes de variações individuais, erros no procedimento anestésico e/ou cirúrgico, dentre outras variáveis. Além disso, diferenças menores que 20% entre médias de dois grupos podem aumentar a ocorrência de erros tipo I ou II.

Dessa forma, estabelecido o valor do desvio padrão em 35% do valor das médias, aplicando na fórmula citada, obtém-se: $n = (((1,96 + 1,28) * 35) / 40)^2 = 8,0$. Conclui-se que seriam necessários, no mínimo, 8 animais em cada grupo experimental.

Em decorrência dos critérios de exclusão estabelecidos (frequência de retirada da pata na avaliação de hiperalgesia mecânica), fixou-se uma perda total de 30%. Sendo assim, para cada grupo de 8 animais necessários para os experimentos, foram submetidos ao procedimento de IR 11 animais.

4.5 TESTES

4.5.1 Testes comportamentais

4.5.1.1 Procedimentos para indução da SDRC-I

O modelo animal da SDRC-I foi induzido por meio da exposição prolongada da pata direita do animal à isquemia, seguida de reperfusão. O modelo seguiu o descrito inicialmente para ratos³⁵ e adaptado para camundongos³⁹. Dessa forma, os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de tiopental (80 mg/kg, i.p.)⁵⁵ e um anel elástico com 1,2 mm de diâmetro interno foi colocado próximo à articulação do tornozelo da pata posterior direita, diminuindo assim o seu fluxo sanguíneo por três horas. Em seguida, o anel foi retirado, permitindo a reperfusão^{35,55,56} dos tecidos da pata.

4.5.1.2 Tratamento com ômega-3

O tratamento preventivo com óleo de peixe foi realizado por meio de gavagem, via intragástrica, utilizando o Ômega-3 (Natural Quanta, PA, EUA), 1.000 mg contendo 400 mg de EPA e 300 mg de DHA. Os animais receberam 50 µl do óleo de peixe em cada tratamento, correspondendo à aproximadamente 1,5 g/kg, dose previamente utilizada em estudo experimental³⁸.

4.5.1.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de von Frey, com carga de 0,6 g⁵⁵. Para a realização do teste os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo, posicionada sobre uma plataforma com malha de arame, a fim de permitir o acesso à superfície plantar da pata dos animais. O teste consistiu na aplicação do filamento de von Frey durante 5 segundos na pata posterior direita, atendendo aos seguintes critérios: i) a aplicação foi realizada perpendicularmente à superfície plantar; ii) a pressão foi suficiente para proporcionar a curvatura do filamento; iii) os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela de apoio; iv) a resposta de

retirada da pata foi considerada positiva quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio. O resultado do teste foi expresso em porcentagem de resposta mediante a 10 aplicações do estímulo, onde as porcentagens indicaram presença de hiperalgesia mecânica ou não, conforme escore obtido.

No dia anterior a indução do modelo de SDRC-I, os animais foram submetidos ao teste de von Frey para determinação da resposta basal. Foram selecionados apenas os animais que apresentarem uma porcentagem de resposta de até 20%.

4.5.1.4 Teste de esquiva ao estímulo mecânico

O teste de esquiva ao estímulo mecânico (do inglês, *Mechanical Conflict-Avoidance System* - MCAS) avaliou a capacidade cognitiva relacionada à dor no modelo de SDRC-I. O teste foi realizado em um aparato que apresenta três câmaras de acrílico vermelho transparente. A câmara 1 de 12,5 cm³, é iluminada com LED, servindo como um estímulo levemente aversivo, a fim de incentivar a "fuga" do animal para as câmaras escuras. Essa câmara com luz de LED é separada do restante da unidade por uma barreira móvel. A câmara 2 é a câmara de teste com 27 cm de comprimento que liga as câmaras 1 e 3. A câmara 3 também com 12,5 cm³ é escura e fica na extremidade oposta à câmara 1. O piso da câmara 2 do aparato é composto por sondas de aço de aproximadamente 0,5 mm de diâmetro e 2 mm de altura, as quais promovem um estímulo mecânico nas patas dos animais. Para o teste, os animais foram colocados na câmara 1 com a barreira fechada. O LED foi aceso após 15 segundos e a barreira removida 20 segundos depois. O tempo que os animais levaram para sair da câmara 1 e cruzar o ponto médio da câmara 2 foi usado como medida de resultado experimental⁵⁷.

4.5.1.5 Teste do campo aberto

Para verificar o efeito da suplementação com ômega-3 no modelo de SDRC-I e possível indução de efeito sedativo nos animais, a função locomotora espontânea foi avaliada por meio do teste do campo aberto. O aparato consiste em uma arena quadrada de madeira com 40 x 40 x 40 cm de dimensões. Os animais foram colocados individualmente no centro do aparato, permitindo que explorassem livremente por um

período de 5 min⁵⁸. O comportamento exploratório do animal foi filmado e posteriormente foram avaliadas a distância total de locomoção percorrida (em metros) e a velocidade máxima (metros/segundos) utilizando-se o software ANYmaze® (Stoelting, USA). O aparato foi limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes, a fim de evitar indícios de odor animal.

4.5.2 Ensaio bioquímicos

4.5.2.1 Análise das concentrações de citocinas por meio de ensaio de imunoabsorção ligado a enzima

Para a análise de citocinas foram retiradas as amostras da medula espinal e músculo da pata direita de todos os animais 24 horas após a indução do modelo de DPIC. Após a remoção, as amostras foram colocadas em tubos e armazenados em freezer -80°C. Foram homogeneizadas em tampão fosfato (PBS) contendo: Tween 20 (0,05%), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) (0,1mM), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) (10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzetônio (0,1 mM). Posteriormente, foram centrifugadas a 6900 x g por 10 minutos (4°C), sendo que o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C, para análise. O conteúdo proteico total do sobrenadante foi mensurado utilizando o método de Bradford⁵⁹, assim como uma curva padrão de calibração com albumina do soro bovino (BSA) (0,05 a 0,5 mg/ml). Alíquotas de 100 µL foram utilizadas para mensurar as concentrações das citocinas: TNF e IL-1β; através de kits de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) DuoSet para camundongos (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Para a mensuração das concentrações das citocinas foi utilizada a interpolação de uma curva padrão de 7 pontos, por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) em um leitor de placas (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China) e os valores finais foram expressos como pg/mg de proteína.

4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Quadro 3 – Variáveis do estudo

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Frequência de resposta de retirada da pata ao estímulo mecânico (hiperalgesia mecânica)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Porcentagem da frequência de resposta (média $\pm$ desvio padrão)
Teste de esquiva ao estímulo mecânico	Dependente	Quantitativa contínua	Latência em segundos
Atividade locomotora	Dependente	Quantitativa contínua	Distância percorrida Velocidade máxima
Concentrações teciduais de TNF e IL-1 β	Dependente	Quantitativa contínua	Picograma por mg/proteína (média $\pm$ desvio padrão)
Suplementação de ômega-3	Independente	Qualitativa nominal	Sim/não
Isquemia reperfusão da pata	Independente	Qualitativa nominal	Sim/não

4.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

4.7.1 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) para cada grupo. Inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. O teste da hiperalgesia mecânica foi analisado usando ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. O teste de esquiva ao estímulo mecânico, bem como o teste de campo aberto e mensuração de citocinas pró inflamatórias foram analisados usando o teste t não pareado. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. As estatísticas foram calculadas usando o software Graph-Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA, 2009).

4.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi encaminhado e aprovado (protocolo nº 18.050.4.01.IV) pela CEUA da UNISUL (ANEXO A). Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações

experimentais da dor em animais conscientes⁵⁵, assim como foram utilizados os aspectos éticos da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a utilização de Animais para fins científicos e didáticos – DBCA, 2016. Sendo que tal Diretriz, assim como a legislação brasileira, estabelece a responsabilidade primária em determinar se a utilização de animais for devidamente justificada e garante a adesão aos princípios de substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*). O número de animais que foram utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram o mínimo necessário para demonstrar o efeito do tratamento recebido.

A MIA dos animais foi realizada mediante utilização de injeção intraperitoneal de uma dose excessiva de anestésico de acordo com a resolução 1000, de 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária, sob a supervisão de médico veterinário responsável. A dose foi obtida por meio da mistura de xilazina (100 mg/kg) e cetamina (200 mg/kg), e foi injetado em cada animal 0,7 ml.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Essa sessão será apresentada no formato do artigo científico que será submetido na revista Neuroscience - Elsevier.

Omega-3 fatty-acids supplementation decreases proinflammatory cytokines and hyperalgesia in a murine model of complex regional pain syndrome type I

Taynah de Oliveira Galassi^a, Paula Franson Fernandes^a, Afonso Shiguemi Inoue Salgado^{a,b}, Francisco José Cidral-Filho^a, Anna Paula Piovezan^a, Franciane Bobinski^{a,#}, Daniel F. Martins^{a,#,*}

^aExperimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil.

^bCoordinator of the Integrative Physical Therapy Residency – Philadelphia University Center, Londrina, PR, Brazil.

#Co-Senior authors

***Corresponding author:**

Daniel F. Martins, PhD, Experimental Neuroscience Laboratory, Post-Graduate Program of Health Science, Southern University of Santa Catarina, Campus Grande Florianópolis, Palhoça, Santa Catarina, Brazil. Phone: +55 48 3279- 1057; E-mail: daniel.martins4@unisul.br

ABSTRACT

Introduction: Complex regional pain syndrome type I (CRPS-I) is characterized as a chronic and disabling clinical condition that poorly responds to different treatments. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of inflammatory disorders is well described in the literature. Despite the proven anti-inflammatory effects of omega-3, there are few studies in the literature evaluating its therapeutic benefits in different types of pain.

Aim: We evaluated the potential anti-inflammatory and antihyperalgesic effects of preventive omega-3 supplementation in an animal model of CRPS-I in mice.

Methods: Female mice were supplemented for 30 days with omega-3 before the induction of the CRPS-I model and 14 days after. Mechanical hyperalgesia was daily evaluated from the 4th day after ischemia and reperfusion (IR) procedure until the 14th day. The animals were also submitted to the pain-related cognitive ability test and spontaneous locomotor activity analysis. In addition, other female mice were supplemented for 30 days with omega-3 and then subjected to the IR procedure. Twenty-four hours later, assisted painless death was conducted and samples of the spinal cord and right posterior paw muscle were taken to measure the proinflammatory cytokine TNF and IL-1 β concentrations.

Results: Preventive omega-3 supplementation elicited antihyperalgesic effects and reduced the concentrations of proinflammatory cytokines TNF in the spinal cord and IL-1 β in the paw muscle of mice subjected to IR. No changes were found in the spontaneous locomotion of animals supplemented with omega-3.

Conclusion: Preventive omega-3 supplementation was effective in reducing mechanical hyperalgesia, as well as producing anti-inflammatory effects reducing proinflammatory cytokine concentrations. The 30-day supplementation at the tested dose was safe and effective in the CRPS-I animal model and presented no sedative effects.

Keywords: Pain. Preventive supplementation. Pain following chronic ischemia. Omega-3 polyunsaturated fatty acids.

6. CONCLUSÃO

Através dos achados desse estudo, pode-se concluir que:

- 1- A suplementação preventiva de ômega-3 foi eficaz na redução da hiperalgesia mecânica nas fases aguda (inflamatória) e crônica (neuropática) do modelo animal da SDRC-I.
- 2- A suplementação preventiva de ômega-3 não apresentou efeito significativo no teste da capacidade cognitiva relacionada à dor.
- 3- A suplementação preventiva de ômega-3 apresentou efeito anti-inflamatório, uma vez que reduziu as concentrações das citocinas pró inflamatórias TNF na medula espinal e IL-1 β no musculo da pata posterior direita dos animais submetidos ao procedimento de IR.
- 4- A suplementação preventiva e crônica de ômega-3, de 30 dias, na dose testada, não alterou a locomoção dos animais, mostrando-se segura e eficaz.

Em suma, em um modelo não-clínico da SDRC-I em camundongos, a suplementação preventiva de ômega-3 mostrou efeito anti-hiperalgésico acumulativo e prolongado da hiperalgesia mecânica apresentou maior significância e durabilidade (horas) conforme maior período de suplementação (dias). Os achados do presente estudo estendem e corroboram com os dados da literatura, já que apresenta os benefícios da suplementação de ômega-3 em um modelo animal da SDRC-I, avaliando as fases aguda (inflamatória) e crônica (neuropática) do modelo. Além disso, apresenta também uma dose segura e eficaz de suplementação de ômega-3 em camundongos, na condição estudada.

Como perspectivas futuras, pretende-se aprofundar a análise do mecanismo de ação da suplementação de ômega-3 no efeito anti-hiperalgésico no modelo de dor da SDRC-I estudado, como por exemplo, avaliar em diferentes tempos o perfil de citocinas anti-inflamatórias e pró-resolutivas.

REFERÊNCIAS

1. Midbari A, Suzan E, Adler T, et al. Amputation in patients with complex regional pain syndrome: a comparative study between amputees and non-amputees with intractable disease. *Bone Joint J.* 2016; 98: 548-554.
2. Al Sayegh S, Filén T, Johansson M, et al. Mirror therapy for Complex Regional Pain Syndrome (CRPS)—A literature review and an illustrative case report. *Scand. J. Pain.* 2013; 4: 200-207.
3. Wasner G, Backonja M-M and Baron RJ. Traumatic neuralgias: complex regional pain syndromes (reflex sympathetic dystrophy and causalgia): clinical characteristics, pathophysiologic mechanisms and therapy. *Neurol. Clin.* 1998; 16: 851-868.
4. Coderre TJ and Bennett GJ. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome-type I (reflex sympathetic dystrophy): pain due to deep-tissue microvascular pathology. *Pain Medicine.* 2010; 11: 1224-1238.
5. Lee JW, Lee SK and Choy WS. Complex Regional Pain Syndrome Type 1: Diagnosis and Management. *J. Hand. Surg.* 2018; 23: 1-10.
6. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Eur. Neurol. Rev.* 2003; 60: 1524-1534.
7. Nobre ME, Correia AO, de Brito Borges M, et al. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid exert anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents at low doses. *Nutr. Res.* 2013; 33: 422-433.
8. Zhang E, Kim J-J, Shin N, et al. High omega-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice reduce inflammatory pain. *J. Med. Food.* 2017; 20: 535-541.
9. Carvalho CS, Carvalho AS and Portela FS. Uso Indiscriminado e Irracional de Anti-inflamatórios não Esteroidais (Aines) por Pacientes Idosos em uma Rede de Farmácias do Sudoeste da Bahia. *Id on Line Rev. M. Psic.* 2018; 12: 1051-1064.
10. Coderre TJ. Complex regional pain syndrome: what's in a name? *J. Pain.* 2011; 12: 2-12.
11. Stanton-Hicks M, Jänig W, Hassenbusch S, et al. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. *Pain.* 1995; 63: 127-133.

12. Dommerholt J. Complex regional pain syndrome - I: history, diagnostic criteria and etiology. *J. Bodyw. Mov.* 2004; 8: 167-177.
13. Field JJ. Complex regional pain syndrome: a review. *J. Hand Surg.* 2013; 38: 616-626.
14. Vural SP, Yuzer GF, Ozcan DS, et al. Effects of mirror therapy in stroke patients with complex regional pain syndrome type I: a randomized controlled study. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2016; 97: 575-581.
15. Borchers A and Gershwin ME. Complex regional pain syndrome: a comprehensive and critical review. *Autoimmun.* 2014; 13: 242-265.
16. Bussa M, Guttilla D, Lucia M, et al. Complex regional pain syndrome type I: a comprehensive review. *Acta Anesthesiol. Scand.* 2015; 59: 685-697.
17. Gaspar AT and Antunes F. Síndrome doloroso regional complexo Tipo I. *Acta Med. Port.* 2011; 24:1031-40.
18. Choi YS, Lee MG, Lee HM, et al. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 150 Korean patients. *J Korean Med. Sci.* 2008; 23: 772-775.
19. De Mos M, De Bruijn A, Huygen F, et al. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. *Pain.* 2007; 129: 12-20.
20. Gierthmühlen J, Binder A and Baron RJ. Mechanism-based treatment in complex regional pain syndromes. *Natur. Rev. Neurol.* 2014; 10: 518.
21. Grothusen JR, Alexander G, Erwin K, et al. Thermal pain in complex regional pain syndrome type I. *Pain.* 2014; 17:71-79.
22. Hauser J, Hsu B and Nader ND. Inflammatory processes in complex regional pain syndromes. *Immunol. Invest.* 2013; 42: 263-272.
23. Schmid-Schönbein GW. Analysis of inflammation. *Annu. Rev. Biomed.* 2006; 8: 93-151.
24. Xia H, Chen L, Liu H, et al. Protectin DX increases survival in a mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. *Sci. Rep.* 2017; 7: 99.
25. Mosser DM and Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Natur. Rev. Immunol.* 2008; 8: 958.
26. Mubarak SJ, Pedowitz RA and Hargens AR. Compartment syndromes. *Current Orthopaedics.* 1989; 3: 36-40.

27. Lyden SP, Shortell CK and Illig KA. Reperfusion and compartment syndromes: strategies for prevention and treatment. *Semin. Vasc. Surg.* 2001, pp.107-113.
28. Kellogg EW and Fridovich IJ. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 1975; 250: 8812-8817.
29. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovas. Surg.* 2002; 10: 620-630.
30. Martinez FO, Helming L and Gordon SJ. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 451-483.
31. Loeser JD and Treede R-DJP. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* 2008; 137: 473-477.
32. Verri Jr WA, Cunha TM, Parada CA, et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol. Ther.* 2006; 112: 116-138.
33. Jin X and Gereau RW. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . *J. Neurosci.* 2006; 26: 246-255.
34. Birklein F, Ibrahim A, Schlereth T, et al. The rodent tibia fracture model: a critical review and comparison with the complex regional pain syndrome literature. *J. Pain.* 2018.
- 35.Coderre TJ, Xanthos DN, Francis L, et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain.* 2004; 112: 94-105.
36. Bratti T. Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos. 2012.
37. Fabian CJ, Kimler BF and Hursting SD. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Res.* 2015; 17: 62.
38. Silva RV, Oliveira JT, Santos BL, et al. Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Supplementation Accelerates Nerve Regeneration and Prevents Neuropathic Pain Behavior in Mice. *Front. Pharmacol.* 2017; 8: 723.

39. Titos E, Rius B, González-Pérez A, et al. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J. Immunol.* 2011; 5408-5418.
40. Millecamps M, Laferrière A, Ragavendran JV, et al. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). *Pain.* 2010; 151: 174-183.
41. Tan A, Sullenbarger B, Prakash R, et al. Supplementation with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduces high levels of circulating proinflammatory cytokines in aging adults: A randomized, controlled study. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2018; 132: 23-29.
42. Calder P. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* 2005; 2:423-427.
43. Pauls SD, Rodway LA, Winter T, et al. Anti-inflammatory effects of α -linolenic acid in M1-like macrophages are associated with enhanced production of oxylipins from α -linolenic and linoleic acid. *J. Nutr. Biochem.* 2018; 57: 121-129.
44. Zhang L, Terrando N, Xu Z-Z, et al. Distinct Analgesic Actions of DHA and DHA-Derived Specialized Pro-Resolving Mediators on Post-operative Pain After Bone Fracture in Mice. *Front. Pharmacol.* 2018; 9.
45. Nakamoto K, Nishinaka T, Mankura M, et al. Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2010; 33: 1070-1072.
46. Figueroa JD, Cordero K, Serrano-Illan M, et al. Metabolomics uncovers dietary omega-3 fatty acid-derived metabolites implicated in anti-nociceptive responses after experimental spinal cord injury. *Neuroscience.* 2013; 255: 1-18.
47. Ji R-R, Xu Z-Z, Strichartz G, et al. Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends Neurosci.* 2011; 34: 599-609.
48. Leoni G, Alam A, Neumann P-A, et al. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J. Clin. Inv.* 2012; 123.
49. Nelson JW, Leigh NJ, Mellas RE, et al. ALX/FPR2 receptor for RvD1 is expressed and functional in salivary glands. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013; 306: C178-C185.

50. Levy BD. Resolvin D1 and resolvin E1 promote the resolution of allergic airway inflammation via shared and distinct molecular counter-regulatory pathways. *Front. Immunol.* 2012; 3: 390.
51. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, et al. Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs. *Am. J. Pathol.* 2012; 180: 2018-2027.
52. Rey L. *Planejar e redigir trabalhos científicos*. Edgard Blücher, 2003.
53. Zimmermann MJP. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983; 16: 109-110.
54. Daniel WW. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences (Probability & Mathematical Statistics)*. John Wiley & Sons, New York, 1987.
55. Martins DF, Prado MR, Daruge-Neto E, et al. Caffeine prevents antihyperalgesic effect of gabapentin in an animal model of CRPS-I: evidence for the involvement of spinal adenosine A1 receptor. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2015; 20:403-409.
56. Nucci C, Mazzardo-Martins L, Stramosk J, et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. *J. Ethnopharmacol.* 2012; 143:170-178.
57. Shepherd AJ and Mohapatra DP. Pharmacological validation of voluntary gait and mechanical sensitivity assays associated with inflammatory and neuropathic pain in mice. *Neuropharmacol.* 2018; 130:18-29.
58. Eysenck HJ. *Experiments in personality*. London: Routledge & Paul, 1960; 31-71.
59. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.

ANEXO
ANEXO A – Parecer Aprovação CEUA



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
 Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 4 de dezembro de 2018
 Registro na CEUA (código): 18.050.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do potencial anti-inflamatório, pós-resolutivo e anti-hiperalgésico da suplementação de ômega-3 em um modelo animal da síndrome da dor regional complexa do tipo – I", registrada com o nº 18.050.4.01.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 12 de dezembro de 2018.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,


 Prof. Sandro Melim Sgrott
 Coordenador da Comissão



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 4 de dezembro de 2018

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do potencial anti-inflamatório, pós-resolutivo e anti-hiperalgésico da suplementação de ômega-3 em um modelo animal da síndrome da dor regional complexa do tipo – I", registrada com o nº 18.050.4.01.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 12 de dezembro de 2018.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro de 2019 a Janeiro de 2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogêneo Mus musculus
Nº de animais	110
Peso/Idade	35-45g / 45-60 dias
Sexo	fêmea
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)


 Prof. Sandro Melim Sgrott
 Coordenador da Comissão

ANEXO B – Produções e trabalhos desenvolvidos

1. **Artigo da dissertação de mestrado:** “Omega-3 fatty-acid supplementation decreases pain-like behavior and proinflammatory cytokines in a murine model of complex regional pain syndrome type I.”
2. **Dissertação de mestrado – Paula Franson Fernandes:** “Efeito do tratamento com ômega-3 em um modelo animal de dor pós-isquemia crônica: análise da fase pró-resolutiva da inflamação.”
3. **Dissertação de mestrado – Carlos Minoru Omura:** “Efeito da mobilização articular de tornozelo sobre os parâmetros inflamatórios periféricos em camundongos.”
4. **Artigo (submetido - em revisão) – dissertação de mestrado – Daniela Dero Ludtke:** “High-intensity swimming exercise reduces persistent inflammatory pain in mice by activation of the endocannabinoid system.”
5. **Tese de doutorado – Rômulo Nolasco:** “Avaliação dos efeitos da imersão em água termomineral na hiperalgesia induzida pela ligadura parcial do nervo isquiático de camundongos: análise do mecanismo de ação.”
6. **Revisão sistemática:** “Evaluation of anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of omega-3 supplementation in animal models of inflammatory and neuropathic pain: a systematic review.”
7. **Coorientação de trabalho de conclusão de curso – Revisão sistemática:** “Os efeitos da aromaterapia na redução da hiperalgesia neuropática e inflamatória – uma revisão sistemática a partir de estudos não clínicos.”
8. **Participação e apresentação de trabalho – I Simpósio Sul Brasileiro de Neurociências UFSC Araranguá -** “Preventive omega-3 supplementing presents antihyperalgesic effect in an animal model of complex regional pain syndrome type I.”

SCANDINAVIAN JOURNAL OF
MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS

ORIGINAL ARTICLE

High-intensity swimming exercise reduces inflammatory pain in mice by activation of the endocannabinoid system

Daniela D. Ludtke, Aline Siteneski, Taynah de Oliveira Galassi, Alexandre Carlos Buffon, Francisco José Cidral-Filho, William R. Reed, Afonso Shiguemi Inoue Salgado, Adair R.S. dos Santos, Daniel F. Martins 

First published: 01 May 2020 | <https://doi.org/10.1111/sms.13705>