

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

**ANA PAULA KONZEN RIFFEL**

**VITAMINA C E VITAMINA E ATENUAM A NOCICEPÇÃO E MODIFICAM  
PARÂMETROS OXIDATIVOS E PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO EM MEDULA  
ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

**TESE DE DOUTORADO**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

**ANA PAULA KONZEN RIFFEL**

**VITAMINA C E VITAMINA E ATENUAM A NOCICEPÇÃO E MODIFICAM  
PARÂMETROS OXIDATIVOS E PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO EM MEDULA  
ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

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

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

**PORTO ALEGRE**

**2017**

**ANA PAULA KONZEN RIFFEL**

**VITAMINA C E VITAMINA E ATENUAM A NOCICEPÇÃO E MODIFICAM  
PARÂMETROS OXIDATIVOS E PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO EM MEDULA  
ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

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

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

**Banca Examinadora: DRA. MARCIA GIOVENARDI - UFCSPA**

DRA. CARLA DALMAZ - UFRGS

DR. GUILHERME BALDO - UFRGS (RELATOR)

---

*A todos os mestres que passaram pela minha vida,  
semeando curiosidade e conhecimento.*

---

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meus passos;

À Profa. Wania Partata, pela orientação ímpar, por estar sempre presente, pela dedicação com as alunas e com a pesquisa. Pela paciência, incentivo, empenho, pelas ricas conversas e pela amizade;

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia Comparada, especialmente a Maria, Jéssica, Adarly, Elza, Thaisla, Taína, Carol, Andréa, Clívia, Francisco e Fran, pelo auxílio nos experimentos, pela amizade e por contribuírem para tornar o trabalho no laboratório tão prazeroso. Também agradeço à profa Renata Rosat e à profa Denise Zancan, por compartilharem o conhecimento;

Ao prof. Luciano S. de Fraga, pelo auxílio com os experimentos de western blot, e por todo o conhecimento compartilhado;

Aos professores do PPG Fisiologia pela contribuição na minha formação;

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

À profa. Maria Amália Pavanato, pelo incentivo para a realização deste curso;

À Cláudia Chiarel Almeida, pelas incontáveis idas ao freezer e pelo cuidado com as amostras;

Ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, especialmente à Tânia e à Profa. Adriane Bello-Klein, pelo empréstimo dos equipamentos;

Ao Laboratório de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, especialmente à Profa. Marilise Brittes Rott, pelo empréstimo dos equipamentos;

À secretaria do PPG Fisiologia, pelo suporte;

Ao CNPq, pela bolsa concedida;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela oportunidade de realizar este curso;

As gurias do Biolar, pela acolhida carinhosa, pela amizade, e por dividirmos o caminho da Pós. Em especial, à Dirleane, Fernanda, Rosângela e Crisla.

A todos os meus amigos, em especial a Maira Moraes, pela amizade e companheirismo nos finais em Porto Alegre. Ao Juliano Sebben, pelos longos anos de amizade e parceria. À Mari, Ani, Tai, Indi e Lu, por estarem sempre por perto. À Fran, Dali e Aninha, pela amizade desde a infância;

Aos colegas da 14ª CRS, pelo apoio e pela amizade. Em especial, à Diandra;

Aos meus familiares, pelo apoio e carinho;

Ao Wagner, pelo apoio constante, pelo cuidado, pela compreensão e pelo carinho. Você também faz parte desta conquista!

Aos meus pais, Arneu e Laci, pelo amor e apoio incondicional. Pelo incentivo, mesmo que este significasse a minha ausência. Pelo sorriso carinhoso com que me recebem toda vez que eu chego em casa. Pelo zelo, paciência, por tudo que fazem para que eu realize meus objetivos. Amo muito vocês!

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Obrigada!

---

*“A utopia está lá no horizonte.  
Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos.  
Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos.  
Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei.  
Para que serve a utopia?  
Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”*

*Eduardo Galeano*

---

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é o resultado da investigação do efeito da administração de ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), isolados ou juntos, por vias intraperitoneal e oral, por 3 e 10 dias, sobre a nocicepção, parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo, e proteínas de sinalização intracelular, em medula espinal de ratos com dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica no nervo isquiático.

A tese está estruturada em nove capítulos, onde inicialmente se apresenta a introdução ao tema, que está organizada em cinco subitens de revisão bibliográfica que abordam os achados relativos ao tema, provenientes da literatura científica atual. Em seguida, é apresentada a hipótese, seguida do objetivo do estudo, que está dividido em dois subitens, o primeiro mostrando o objetivo geral da tese e o segundo, os objetivos específicos. O quarto capítulo contém os materiais e métodos, onde está descrito em detalhes todos os procedimentos realizados ao longo do estudo. No capítulo cinco estão apresentados os resultados na forma de três artigos científicos, os quais mostram os materiais e métodos utilizados e os resultados obtidos em cada um dos estudos.

O primeiro artigo apresenta o efeito da administração de vitaminas C e E, isoladas ou juntas, sobre parâmetros nociceptivos em ratos submetidos à constrição crônica no nervo isquiático, que é um modelo de dor neuropática. Nesse artigo é apresentado ainda o efeito do tratamento com as vitaminas administradas por vias oral e intraperitoneal (i.p.), e do uso combinado de vitaminas C+E concomitante a gabapentina, fármaco normalmente usado para tratar dor neuropática. O artigo apresenta ainda a duração do efeito antinociceptivo das vitaminas após o término do período de 3 e 10 dias de administrações diárias; o resultado das análises dos indicadores de função hepática e renal; e parâmetros oxidativos avaliados em nervo isquiático lesionado e fígado. Este artigo foi publicado na revista *Brain Reserach Bulletin*.

O segundo artigo apresenta o efeito da administração i.p. de vitaminas C, E e C+E, por 3 e 10 dias, sobre a formação de ânion superóxido, e valores de tióis totais, capacidade antioxidante total, peróxido de hidrogênio, metabólitos do NO e hidroperóxidos lipídicos em medula espinal lombossacral de ratos submetidos à dor neuropática induzida por constrição crônica no nervo isquiático. Este artigo está aceito para publicação na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.

O terceiro artigo mostra o efeito da coadministração de vitaminas C e E, i.p., por 3 e 10 dias, sobre as expressões das proteínas p38 fosforilada, Akt e Akt fosforilada, e transportador de vitamina C dependente de sódio do tipo 2 (SVCT-2) em medula espinal lombossacral de ratos com dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica no nervo isquiático. O estudo ainda mostra o efeito do tratamento sobre os valores de ácido ascórbico nesse tecido. Este artigo está em análise na revista *Neuroscience letters*.

O capítulo seis compreende a discussão, onde os principais resultados dos três artigos científicos são discutidos em conjunto, amparados por achados da literatura. No sétimo capítulo são apresentadas as conclusões deste trabalho de doutorado. No capítulo seguinte estão as perspectivas de futuros estudos sobre o tema da tese. No último capítulo encontram-se as referências bibliográficas dos textos científicos consultados apenas para a redação dos capítulos Introdução, Material e Métodos e Discussão. As referências bibliográficas dos artigos científicos são apresentadas ao final de cada artigo.

---

## RESUMO

A dor neuropática (dor devido à lesão no tecido nervoso) é uma condição debilitante, com alta incidência na população mundial. O tratamento dessa condição dolorosa ainda é um grande desafio na clínica devido às ações limitadas dos fármacos atualmente disponíveis e seus consequentes efeitos colaterais. O uso de substâncias com potencial antioxidante no tratamento da dor neuropática vem sendo amplamente discutido devido à participação das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio nessa condição dolorosa. O ácido ascórbico (vitamina C) e o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) representam potentes antioxidantes, os quais são adquiridos por custo relativamente baixo, são bem aceitos pela população, muito utilizados como suplemento alimentar, e parecem possuir algum efeito analgésico, embora esse último efeito tenha ainda muitas questões especulativas e que necessita esclarecimentos. Por estes motivos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das vitaminas C e E, administradas isoladas ou juntas, sobre parâmetros nociceptivos, oxidativos e nitrosativos, e proteínas de sinalização intracelular em ratos com constrição no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), um modelo de dor neuropática.

Após aprovação pelo comitê de ética no uso de animal da UFRGS (#23352), ratos *Wistar* machos, com idade de 60 dias, foram divididos em 3 grupos experimentais: controle (ratos que não sofreram intervenção cirúrgica), *sham* (ratos que tiveram o nervo isquiático direito apenas exposto) e CCI (ratos que tiveram o nervo isquiático exposto e esse recebeu 4 amarraduras em seu tronco comum). Cada grupo experimental foi dividido em subgrupos que receberam administração de veículo (salina ou água de beber acrescidas de Tween 80 a 1%), vitamina C (30 mg/kg/dia), vitamina E (15 mg/kg/dia) ou coadministração de vitaminas C+E nas mesmas doses. As administrações foram intraperitoneal ou por via oral, por período de 3 e 10 dias. Os parâmetros nociceptivos utilizados para avaliar sensibilidade mecânica, sensibilidade térmica e recuperação funcional do nervo foram os testes de von Frey eletrônico, teste da placa quente e do índice funcional do isquiático (IFI), respectivamente. Para avaliar o efeito antinociceptivo da administração i.p. dos tratamentos, os parâmetros nociceptivos foram mensurados antes do procedimento cirúrgico, e aos 3, 5, 7 e 10 dias após a lesão nervosa. Ao final dos períodos de 3 e 10 dias, os animais foram mortos por decapitação, e foi coletado plasma, para determinação de indicadores de função hepática e renal (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama GT, bilirrubina e creatinina); fígado, para determinação da morfologia dos hepatócitos e parâmetros oxidativos (hidroperóxidos lipídicos, Glutathione-S-transferase - GST, e capacidade antioxidante total - TAC); nervo isquiático lesionado, para determinação de parâmetros oxidativos (hidroperóxidos lipídicos e TAC); e o segmento lombossacral da medula espinal, para determinação de parâmetros oxidativos (formação de ânion superóxido - SAG, e valores de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos lipídicos, tióis totais, ácido ascórbico e TAC) e nitrosativos (metabólitos do óxido nítrico - NO). O segmento da medula espinal foi usado ainda para determinar a expressão das proteínas de sinalização p38 fosforilada (p-p38), Akt e Akt fosforilada (p-Akt) e do transportador de vitamina C dependente de sódio do tipo 2 (SVCT-2). Foi avaliada ainda, mediante determinação de parâmetros nociceptivos, a duração do efeito antinociceptivo da vitamina C, vitamina E ou vitaminas C+E após o tratamento, o efeito antinociceptivo das vitaminas C+E administradas por via oral, e a coadministração de vitaminas C+E (via oral) concomitante à gabapentina (i.p.), fármaco normalmente utilizado no tratamento de dor neuropática. Os dados de sensibilidade térmica e mecânica foram analisados por ANOVA de

medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Tukey. Os demais parâmetros foram avaliados por ANOVA de duas vias (fatores: lesão e tratamento), seguida do pós-teste de Tukey.

Os resultados mostraram que vitamina C, vitamina E e vitaminas C+E atenuaram a nocicepção e provocou melhora no IFI tanto aos 3 como aos 10 dias, e que a coadministração das vitaminas induziu efeito antinociceptivo maior do que as mesmas administradas isoladamente em ratos com CCI. O efeito antinociceptivo das vitaminas C+E foi similar, tanto após administração i.p. quanto oral. Também foi observado que o efeito antinociceptivo das vitaminas C, E e C+E durou por várias horas após o término do período de administração de 3 e 10 dias. O uso de vitaminas C+E+gabapentina provocou efeito antinociceptivo maior do que o uso de gabapentina isoladamente. Não foram observadas alterações nos indicadores de função hepática e renal, na morfologia dos hepatócitos e nos parâmetros oxidativos avaliados no tecido hepático. No nervo isquiático lesionado, embora não houve alterações significativas, observou-se acréscimo de 38% na TAC e diminuição de 45% nos hidroperóxidos lipídicos nos animais que receberam vitaminas, comparado aos valores obtidos nos ratos tratados com veículo. Na medula espinal, a administração das vitaminas preveniu a redução nos valores de tióis totais e o aumento na SAG, comparado ao grupo CCI tratado com veículo. Ainda comparado ao grupo veículo, as vitaminas preveniram o aumento nos metabólitos do NO e nos hidroperóxidos lipídicos. A administração de vitaminas C+E também preveniu a redução significativa na expressão do transportador SVCT-2, o aumento nas expressões das proteínas p-p38, p-Akt e Akt, e o aumento no valor do ácido ascórbico, comparado aos ratos CCI que receberam veículo. A administração das vitaminas e a CCI não provocaram alterações significativas na TAC e nos valores de peróxido de hidrogênio na medula espinal.

Assim, os resultados mostram que vitamina C, vitamina E e vitaminas C+E, nas doses aqui estudadas, atenuam a dor neuropática e modificam parâmetros oxidativo e nitrosativo, e de sinalização celular, alterados pela CCI. A administração dessas vitaminas não parece provocar toxicidade ao organismo, e poderiam ser uma alternativa como coadjuvante a medicações clássicas usadas no tratamento de condições de dor neuropática. Porém, é necessária a realização de estudos complementares em humanos, dada às diferenças nas respostas à dor em ratos e humanos.

Palavras-chave: Vitamina C, Vitamina E, dor neuropática, estresse oxidativo.

---

## ABSTRACT

Neuropathic pain (pain due to nerve tissue injury) is a debilitating condition, with a high incidence in the world population. The treatment of this painful condition is still a great challenge in the clinic due to the limited actions of the currently available drugs and their consequent side effects. The use of substances with antioxidant potential in the treatment of neuropathic pain has been widely discussed due to the participation of reactive oxygen and nitrogen species in this painful condition. Ascorbic acid (vitamin C) and  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) are potent antioxidants, which are obtained by relatively low cost, are well accepted by patients, are widely used as a food supplement, and appear to have some analgesic effect, although this last effect still has many speculative issues and needs clarification. For these reasons, the aim of this study was to evaluate the effect of vitamins C and E, administered alone or together, on nociceptive, oxidative and nitrosative parameters and intracellular signaling proteins in rats with chronic constriction injury (CCI), a model of neuropathic pain.

After approval by the ethics committee on animal use of UFRGS (#23352), male Wistar rats, aged 60 days, were divided into 3 groups: control (rats that did not undergo surgery), sham (rats whose right sciatic nerve was only exposed) and CCI (rats whose sciatic nerve was exposed and received 4 ligations in their common trunk). Each experimental group was divided into subgroups that received vehicle injection (saline or drinking water plus Tween 80, 1%), vitamin C (30 mg/kg/day), vitamin E (15 mg/kg/day) or co-administration of vitamins C+E in the same doses. The administrations were by intraperitoneal or oral route, for a period of 3 and 10 days. The nociceptive parameters used to evaluate mechanical sensitivity, thermal sensitivity and nerve functional recovery were the electronic von Frey test, the hot plate test and the sciatic functional index (SFI), respectively. To evaluate the antinociceptive effect of ip administration of vitamin C, vitamin E or vitamins C+E, nociceptive parameters were measured before the surgical procedure and at 3, 5, 7 and 10 days following nerve injury. At the end of the 3 and 10 day periods, the animals were killed by decapitation, and plasma was collected for determination of hepatic and renal function indicators (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma-GT, bilirubin and creatinine); liver, for determination of hepatocyte morphology and oxidative parameters (lipid hydroperoxides, Glutathione-s-transferase - GST, and total antioxidant capacity - TAC); injured sciatic nerve for determination of oxidative parameters (lipid hydroperoxides and TAC); and the lumbosacral segment of the spinal cord for determination of oxidative (superoxide anion formation - SAG, and values of hydrogen peroxide, lipid hydroperoxides, total thiols, ascorbic acid and TAC) and nitrosative (nitric oxide metabolites - NO) parameters. The spinal cord segment was also used to determine the expression of signaling proteins phosphorylated p38 (p-p38), Akt and phosphorylated Akt (p-Akt), and sodium-dependent vitamin C transporter type 2 (SVCT-2). In addition, it was assessed the duration of the antinociceptive effect of vitamin C, vitamin E or vitamins C+E after end of the treatment, the antinociceptive effect of vitamins C+E by oral route, and the antinociceptive effect of co-administration of vitamins C+E (oral route) concomitant with gabapentin (ip), a drug normally used in the treatment of neuropathic pain. Thermal and mechanical sensitivity data were analyzed by repeated measures ANOVA, followed by Tukey's post-test. The other parameters were evaluated by two-way ANOVA (factors: injury and treatment), followed by Tukey's post-test.

The results showed that vitamin C, vitamin E and C+E vitamins attenuated nociception and improved SFI at both 3 and 10 days, and that a greater antinociceptive effect was induced when vitamins were co-administered than when they were given alone in CCI rats. The antinociceptive effect of vitamins C+E was similar after ip and oral administration. It was also observed that the antinociceptive effect of vitamins C, E and C+E lasted for several hours after the end of the administration period of 3 and 10 days. The use of C+E vitamins+gabapentin caused greater antinociceptive effect than the use of gabapentin alone. .No changes were observed in hepatic and renal function indicators, hepatocyte morphology, and oxidative parameters evaluated in the hepatic tissue. Despite no significant, the injured sciatic nerve showed increase (38%) in TAC and reduction (45%) in lipid hydroperoxides in vitamins-treated CCI rats, compared to rats that received vehicle. In spinal cord, the vitamin administration prevented the reduction in total thiol values and the increase in SAG in CCI animals, compared to vehicle-treated CCI rats. Also compared to vehicle-treated CCI rats, the vitamins prevented the increase in NO metabolites and lipid hydroperoxides. The use of vitamins C+E also prevented the significant reduction in SVCT-2 transporter expression, the increase in p-p38, p-Akt, and Akt expressions, and the increase in ascorbic acid levels, compared to CCI rats that received vehicle. Vitamins and CCI did not induce significant changes in TAC and hydrogen peroxide values in the spinal cord.

Thus, the results show that vitamins C, E and C+E, in doses used, attenuated neuropathic pain and changed oxidative, nitrosative and cellular signaling parameters modified by CCI. In addition, the use of vitamins does not appear to induce toxicity to the body and could be an alternative as adjuvant to classical medications used in the treatment of neuropathic pain conditions. However, further studies in humans are needed, given the differences in pain responses in rats and humans.

Keywords: Vitamin C, Vitamin E, Neuropathic pain, Oxidative stress.

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinal lombar, ilustrando a formação do nervo isquiático.....	23
Figura 2: Redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) até a formação de água ( $H_2O$ ) pela ação de enzimas NADPH oxidases (NOx) e da fosforilação oxidativa (FOx).....	25
Figura 3: Breve resumo dos efeitos já conhecidos da dor neuropática e da administração de vitaminas C e E, isoladas e juntas (vitaminas C + E), sobre parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo e de sinalização celular em medula espinal.....	27
Figura 4: Esquema mostrando a regeneração do ascorbato e do $\alpha$ -tocoferol em células do sistema nervoso central.....	32
Figura 5: Representação esquemática dos grupos experimentais.....	40
Figura 6: Sequência de procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos.....	42
Figura 7: Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o índice Funcional do Isquiático (IFI).....	46
Figura 8: Linha temporal da realização dos testes de sensibilidade dolorosa.....	46
Figura 9: Esquema mostrando breve resumo dos principais resultados do presente trabalho.....	138

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – ácido ascórbico
- ABTS<sup>•+</sup> – 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato)
- Akt – proteína cinase B
- ALT – alanina aminotransferase
- AST – aspartato aminotransferase
- ANOVA – análise de variância
- Asc – ascorbato
- AST – aspartato aminotransferase
- ATP – trifosfato de adenosina
- BHT – butil-hidroxitolueno
- CAT – enzima catalase
- CCI – constrição no nervo isquiático (do inglês, *chronic constriction injury*)
- CREAL – centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório
- DHAsc – deidroascorbato
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DNPH – 2,3 dinitrofenilhidrazina
- DRG – gânglio da raiz dorsal
- DTNB – ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico)
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- FOx – fosforilação oxidativa
- GABA – ácido gama-aminobutírico
- Gama GT – gama glutamiltranspeptidase
- GLUT1 – transportador de Glicose do tipo 1
- GLUT3 – transportador de glicose do tipo 3
- GPx – glutationala peroxidase
- GR – glutationala reduzida
- GSH – glutationala na sua forma reduzida
- GSSG – glutationala oxidada
- GST – enzima glutationala transferase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

Hc – hemiconexinas

IASP – *International Association for the Study of Pain*

IFI – índice funcional do isquiático

IL – interleucina

IP3 – inositol-trifosfato

KCl – cloreto de potássio

LOOH – hidroperóxidos lipídicos

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

mTOR – proteína alvo da rampamicina

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH ox 2 – NADPH oxidases tipo 2

NBT – azul de nitrotetrazol

NF-κB – fator nuclear kappa B

NMDA – receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato

NMDA NR1 – subunidade NR1 do receptor NMDA

NO – óxido nítrico

NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub> – metabólitos do NO

NOS – óxido nítrico sintase

NOS n – óxido nítrico sintase neuronal

NO<sub>x</sub> – NADPH oxidases

O<sub>2</sub> – oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – ânion superóxido

OH<sup>•</sup> – radical hidroxil

ONOO<sup>-</sup> – peroxinitrito

p-p38 – p38, na forma fosforilada

p-Akt - Akt, na forma fosforilada

PBS – tampão fosfato-salina

PI3K – fosfatidil inositol-3-cinase

PIP3 – fosfatidilinositol-trifosfato

PMSF – fenil-metil-sulfonil fluoreto

RNS – espécies reativas de nitrogênio (do inglês, *reactive nitrogen species*)

ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)

SAG – geração de ânion superóxido

SNC – sistema nervoso central

SOD – enzima superóxido dismutase

SVCT-2 – do inglês, *sodium-dependent vitamin C transporter 2*

TAC – capacidade antioxidante total

TNB – ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$

TPP – trifetilfosfina

TRPM2 – receptor de canal de melastatina do tipo 2

TRPV – receptor vanilóide de potencial transitório do tipo 1

VSOAC – canais de ânions orgânicos sensíveis a volume

XO – xilenol laranja

---

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>14</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>15</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1 DOR E NOCICEPÇÃO .....	20
1.2 USO DE MODELOS ANIMAIS .....	22
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO E SISTEMAS ANTIOXIDANTES: PARTICIPAÇÃO NA NOCICEPÇÃO.....	24
1.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR E DOR .....	28
1.5 ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C) E $\alpha$ -TOCOFEROL (VITAMINA E).....	30
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 ANIMAIS: PROCEDÊNCIA E MANUTENÇÃO .....	38
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
4.3 CONSTRIÇÃO NO NERVO ISQUIÁTICO.....	39
4.4 ADMINISTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES VEÍCULO E DE VITAMINAS C E E .....	41
4.5 PARÂMETROS NOCICEPTIVOS .....	42
<b>4.5.1 Determinação do limiar mecânico</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5.2 Determinação do limiar térmico</b> .....	<b>43</b>
<b>4.5.3 Determinação do índice funcional do isquiático</b> .....	<b>44</b>
4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	46
4.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO .....	46
<b>4.7.1 Formação de ânion Superóxido (<math>O_2^{\bullet-}</math>)</b> .....	<b>46</b>
<b>4.7.2 Peróxido de Hidrogênio (<math>H_2O_2</math>)</b> .....	<b>47</b>
<b>4.7.3 Metabólitos do NO</b> .....	<b>47</b>
<b>4.7.4 Hidroperóxidos lipídicos</b> .....	<b>48</b>
<b>4.7.5 Capacidade antioxidante total</b> .....	<b>48</b>
<b>4.7.6 Tióis totais</b> .....	<b>48</b>
<b>4.7.7 Ácido ascórbico</b> .....	<b>49</b>
<b>4.7.8 Quantificação de proteínas</b> .....	<b>49</b>
<b>4.7.9 Glutaciona-s-transferase (GST)</b> .....	<b>50</b>
4.8 TÉCNICA DE WESTERN BLOT .....	50

4.9 INDICADORES DE FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA .....	51
4.10 TÉCNICA DE HEMATOXILINA E EOSINA .....	51
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
4.12 DISPOSIÇÃO FINAL DOS RESÍDUOS DA PESQUISA .....	53
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
5.1 ARTIGO 1 .....	54
5.2 ARTIGO 2 .....	64
5.3 ARTIGO 3 .....	95
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>124</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>138</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>139</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>155</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial à sobrevivência e bem estar de um organismo (BASBAUM et al., 2009; COHEN; MAO, 2014; WOLLER et al., 2017). A interpretação da informação sensorial nociva feita pelo sistema nervoso recebe o nome de dor. A dor é uma sensação desagradável que aumenta o estado de alerta e pode prevenir danos ao corpo (GWAK; HULSEBOSCH; LEEM, 2017) ou se tornar uma condição debilitante (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). De acordo com a definição da Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*, 2008), a dor é uma experiência sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugere tal dano. Esta condição envolve não somente componentes sensoriais, mas também emocionais (LOESER; TREEDE, 2008).

Ao se falar em dor, é importante distinguir dor de nocicepção. A dor possui natureza subjetiva; ela é a percepção de sensações desagradáveis, e pode ser modulada por vários fatores cognitivos, tais como distração, atenção, emoções e elementos socioculturais (PIMENTA, 1998; MEINELT et al., 2007; LOESER; TREEDE, 2008; COHEN; MAO, 2014; WIECH, 2016;). A nocicepção, por sua vez, refere-se ao processo neural de codificação e processamento de estímulo nocivo (LOESER; TREEDE, 2008). Ela é detectada por nociceptores (receptores sensoriais capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos), codificada como mensagem nociceptiva, que é transmitida e processada em diferentes regiões do sistema nervoso central (SNC) (LOESER; TREEDE, 2008; BASBAUM et al., 2010; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; WOLLER et al., 2017). De modo geral, a informação de estímulos nocivos é modulada no SNC. A modulação ocorre em diferentes níveis do neuroeixo, incluindo a região de entrada da informação no SNC, como exemplo corno dorsal da medula espinal. Considerando ainda o exemplo, a modulação continua ao longo da via sensorial, em núcleos localizados no tronco encefálico e em centros talâmicos e estruturas corticolímbicas (D'MELLO; DICKENSON, 2008; TOMPKINS; HOBELMANN; COMPTON, 2017; WOLLER et al., 2017).

A dor pode ser classificada quanto a intensidade (leve, moderada ou severa), duração (aguda ou crônica) ou tipo (nociceptiva, inflamatória ou neuropática) (DAS, 2015). Ela representa um importante problema de saúde pública, estando associada a várias patologias (PIMENTA, 1998; PICA VET; SCHOUTEN, 2003; FINNERUP et al., 2015; CARR; MCCALL, 2017;) A dor, na forma aguda ou crônica, é a principal razão de procura pelo sistema de saúde e está entre as principais causas de incapacitação e absenteísmo ao trabalho (PICA VET; SCHOUTEN, 2003; LANGLEY; RUIZ-IBAN, 2011). No Brasil, estima-se que a dor crônica atinja em torno de 22 a 40% da população adulta (DELLAROZA et al., 2013; NASCIMENTO; COSTA, 2015; DEPINTOR et al., 2016; LEOPOLDINO et al., 2016;).

Um dos tipos de dor é a neuropática, que é definida como a dor originada como consequência direta de lesão ou doença que afete o sistema somatossensorial, em seus componentes periféricos (dor neuropática periférica) ou no SNC (dor neuropática central) (IASP, 2008; LOESER; TREEDE, 2008; COHEN; MAO, 2014;). Nessa condição dolorosa, o sistema nervoso responde inapropriadamente ao dano mediante múltiplos mecanismos que resultam em interpretações inadequadas dos impulsos sensoriais e sensações dolorosas espontâneas (VAN HECKE et al., 2014; MEACHAM et al., 2017). A etiologia da dor neuropática pode estar relacionada a traumas mecânicos, doenças metabólicas, alcoolismo, exposição a toxinas, neoplasias, lesões vasculares, isquemia, entre outros (BARON; BINDER; WASNER, 2010; FINNERUP et al., 2015; PASERO, 2004).

O quadro de dor neuropática é complexo e de difícil tratamento. As estratégias terapêuticas são limitadas pelo entendimento incompleto de sua patofisiologia (GEIS et al., 2017; MEACHAM et al., 2017). Por este motivo há um interesse mundial na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática. Outro motivo é sua grande incidência na população. Estima-se que este tipo de dor afeta entre 6% a 10% da população mundial, gerando custos significativos para os indivíduos e aos sistemas de saúde (HEHN; BARON; WOOLF, CLIFFORD, 2012; VAN HECKE et al., 2014; FINNERUP et al., 2015; COLLOCA et al., 2017;). É provável que a dor neuropática periférica se torne ainda mais prevalente devido ao envelhecimento global da população, ao aumento da incidência de diabetes mellitus, e ao maior índice de sobrevida às quimioterapias para tratamento de cânceres, todas essas condições que afetam os nociceptores (COLLOCA et al., 2017).

A dor neuropática reduz significativamente a qualidade de vida das pessoas acometidas por ela e frequentemente está associada à ansiedade, depressão e distúrbios de

sono (DWORKIN et al., 2007; FINNERUP et al., 2015; COLLOCA et al., 2017; ZHAO et al., 2017). É comum aos pacientes que experienciam dor neuropática alterações sensoriais como alodinia (dor frente a um estímulo inócuo) e hiperalgesia (resposta exacerbada frente a um estímulo nocivo) (DAS, 2015), as quais caracterizam o quadro chamado sensibilização (aumento na responsividade de neurônios à estimulação normal ou recrutamento de uma resposta a estímulos normalmente sublimiáveis). A sensibilização ocorre na periferia (sensibilização periférica) e no SNC (sensibilização central). A sensibilização central parece ser um fenômeno chave na fisiopatologia da dor neuropática (DAS, 2015; MEACHAM, et al., 2017).

Os mecanismos envolvidos na sensibilização são complexos, multifatoriais, evoluem ao longo do tempo (PASERO, 2004) e envolvem a participação de inúmeras substâncias químicas (CHEN et al., 2010), algumas das quais serão abordadas ao longo deste texto. Esta sintomatologia ainda está sujeita a variações interindividuais, presença de comorbidades e característica genética (COHEN; MAO, 2014; VAN HECKE et al., 2014).

O manejo da dor neuropática ainda é um grande desafio. A principal abordagem utilizada atualmente no tratamento dessa dor é a farmacológica, onde se destaca os fármacos gabapentina, pregabalina (análogos de GABA), opióides e antidepressivos tricíclicos (FINNERUP et al., 2015). Os tratamentos são inespecíficos, com eficácia limitada e associados a efeitos adversos variados, como sedação, sonolência, taquicardia, náusea, retenção urinária e ganho de peso. Apenas 30 a 50% dos pacientes relatam alívio satisfatório da dor com o uso de um ou mais desses fármacos (DWORKIN et al., 2007; MAGRINELLI; ZANETTE; TAMBURIN, 2013). Por isso, é necessário esclarecer os mecanismos patofisiológicos associados ao desenvolvimento e manutenção da dor neuropática, e ampliar o arsenal de possibilidades terapêuticas com o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos.

## **1.2 USO DE MODELOS ANIMAIS**

Os estudos de dor em seres humanos permitem abordagem limitada. Por isso, os modelos animais, especialmente roedores, são os mais comumente utilizados na busca de avanços no entendimento dos mecanismos patofisiológicos e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a dor neuropática (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). Apesar de não possuírem capacidade de verbalizar sua percepção do

estímulo doloroso, os animais exibem respostas motoras similares às dos humanos quando em contato com estímulos nociceptivos, as quais permitem inferir a existência de nocicepção. Assim, a nocicepção é a abordagem mais apropriada em estudos com modelos animais (DUBNER, 1983; KAVALIERS, 1988).

Dentre os modelos de dor neuropática, o modelo de constrição crônica no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), desenvolvido por BENNETT & XIE (1988), é um dos mais comumente utilizados por simular situações clínicas comuns aos humanos, como causalgia ou síndrome da dor complexa regional (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Neste modelo, quatro amarraduras com fio de sutura bioabsorvível são colocadas no tronco comum do nervo isquiático (Figura 1), de modo que um segmento de aproximadamente 7 mm desse nervo fica lesionado pelo estrangulamento e pela posterior reação inflamatória local. Este modelo permite a detecção da dor espontânea e da dor evocada, o que o torna capaz de mimetizar síndromes dolorosas comuns em humanos.

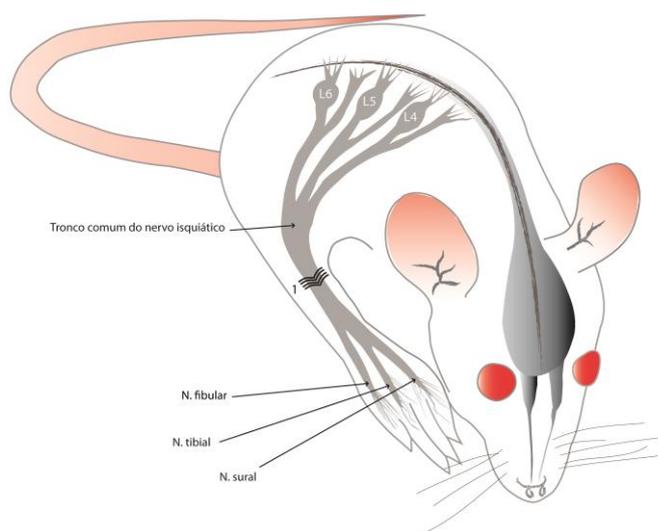


Figura 1 – Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinal lombar, ilustrando a formação do nervo isquiático. Nas raízes dorsais do nervo isquiático estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5, L6) desse nervo, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente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

A constrição no nervo isquiático é associada com edema intraneural, isquemia e degeneração walleriana (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Em virtude dessa lesão ocorrem descargas ectópicas, alterações na expressão e funcionalidade de canais iônicos, modificações em vias de neurotransmissão e em vias de sinalização intracelular, e alterações em células gliais (MEACHAM et al., 2017; ZHAO et al., 2017). Há também liberação de mediadores químicos com papel importante na sinalização nociceptiva, dos quais se destaca o glutamato

(D'MELLO; DICKENSON 2008; ZHUO, 2016), a substância P e as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e de nitrogênio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*). Essas alterações ocorrem tanto na periferia como na região de entrada da informação dolorosa no SNC, a medula espinal e o tronco encefálico, e se estendem a regiões mais superiores do neuroeixo, contribuindo para a hiperalgesia e a alodinia (BASBAUM et al., 2009; JAGGI; JAIN; SINGH, 2011; YOWTAK et al., 2011; NICKEL et al., 2012; JANES et al., 2013; COLLOCA et al., 2017; MEACHAM et al., 2017). Dentre essas alterações, devido aos propósitos deste texto, será destacada a participação das ROS e RNS na dor neuropática.

### **1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO E SISTEMAS ANTIOXIDANTES: PARTICIPAÇÃO NA NOCICEPÇÃO**

As ROS e RNS contribuem para os processos de sensibilização central e periférica, e vem sendo alvos de muitos estudos relacionados ao desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (KIM, et al., 2004; GRACE et al., 2016; GEIS et al., 2017). As ROS são geradas como intermediários no metabolismo energético normal das células (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013; KIM, et al., 2015). Existem inúmeras fontes endógenas de ROS e RNS, como as enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NADPH oxidases) e óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) sintases (NOS), e a respiração mitocondrial (KIM, et al., 2004; GRACE et al., 2016). As ROS podem ser radicalares, como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), ou não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $O_2^{\bullet-}$  pode potencialmente reagir com componentes celulares próximos, mas é rapidamente convertido a  $H_2O_2$ , uma molécula mais estável que o  $O_2^{\bullet-}$  (Figura 2). Ainda, o  $H_2O_2$  pode reagir com metais de transição, como ferro e cobre, presentes na célula, dando origem ao radical  $OH^{\bullet}$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2012). Este último é extremamente reativo, propagando a formação de ROS como uma reação em cadeia, mediante remoção de elétrons de outras moléculas e transformação destas em novos radicais. O  $H_2O_2$ , por sua vez, tem menor reatividade, mas pode se difundir pelo citoplasma e eventualmente chegar ao núcleo e reagir com o DNA (KIM et al., 2015; BECKHAUSER; FRANCIS-OLIVEIRA; PASQUALE, 2016).

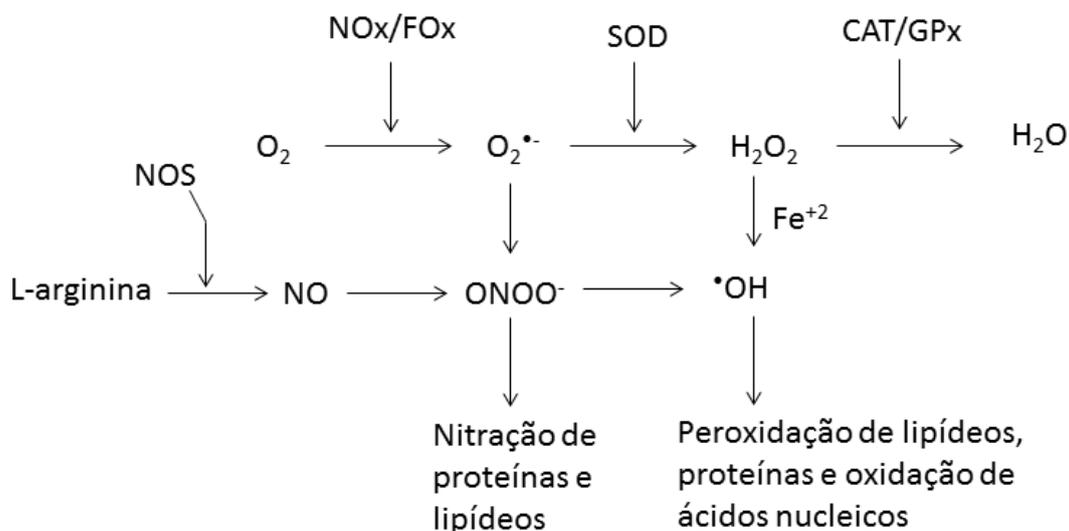


Figura 2: Redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) até a formação de água ( $H_2O$ ) pela ação de enzimas NADPH oxidases (NOx) e da fosforilação oxidativa (FOx). No esquema é mostrada a formação de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), de radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), assim como a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). No esquema ainda é mostrada a formação de óxido nítrico (NO) pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Adaptado de Grace et al., 2016).

Outras moléculas com papel importante no sistema nervoso são as RNS, originadas a partir do NO. Este último é formado pela ação das enzimas NOS, que catalisam a oxidação da arginina para a formação de NO (DROGE, 2002; GRACE et al., 2016). Os efeitos citotóxicos e a nitração de proteínas são ocasionados principalmente por meio dos produtos secundários do NO, como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), formado pela reação rápida do NO com  $O_2^{\bullet-}$  (HALLIWELL, 2012). O  $H_2O_2$  e o  $ONOO^-$  podem também gerar radical  $OH^{\bullet}$ , que atua na peroxidação de lipídeos e proteínas, e oxidação de ácidos nucleicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2012; GRACE et al., 2016).

Devido a sua natureza altamente reativa, as ROS e as RNS, quando em excesso, podem levar a situações de estresse celular mediado por oxidantes (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013; POLJSK et al., 2013; SIES, 1991, 2015; GRACE et al., 2016). Por outro lado, em baixas concentrações, essas espécies atuam benéficamente em diversas funções fisiológicas, como respostas mitogênicas, ativação de fatores de transcrição e regulação de vias de sinalização intracelular (DROGE, 2002; ADAMS et al., 2015; PIZZINO et al., 2017). De acordo com Poljsak et al. (2013), um ambiente levemente pró-oxidativo é necessário para manter os processos de sinalização em condições ideais, o que sugere que as correções nas concentrações de ROS e RNS devem ser sutis.

A homeostase redox das células é cuidadosamente mantida por um elaborado sistema de defesas antioxidantes, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos (POLJSAK et al., 2013). Os antioxidantes são moléculas que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável previnem a oxidação do substrato (HALLIWELL, et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os antioxidantes possuem papel essencial na regulação da produção de ROS e na proteção do meio intracelular aos danos causados pelo excesso de ROS e RNS (DROGE, 2002; PIZZINO et al., 2017). Dentre as primeiras linhas de defesas antioxidantes enzimáticas, destaca-se a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão de  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$ , por sua vez, pode ser eliminado pela catalase (CAT) ou peroxidases. Dentre as peroxidases se destaca a Glutathione peroxidase (GPx), que utiliza diversas moléculas redutoras, como o ácido ascórbico, a glutathione (GSH) e a tioredoxina (FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Entre os antioxidantes não enzimáticos, destaca-se o ácido ascórbico, a GSH e o alfa-tocoferol. A GSH é um tripeptídeo capaz de reduzir e regenerar várias moléculas oxidadas, atuando também como um eficiente *scavenger* de ROS e de  $ONOO^-$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O ácido ascórbico atua diretamente como *scavenger* de ROS e é um importante antioxidante. Ele também possui função como neuromodulador e neuroprotetor no SNC e atua na reciclagem da vitamina E (COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015).

Em condições de dor neuropática, diversos estudos mostram mudanças em antioxidantes e incrementos na formação de ROS e RNS, tanto no local da lesão como em regiões do SNC (NAIK et al., 2006; GUEDES et al., 2008; SCHEID et al., 2013; HORST et al., 2014; KIM et al., 2015). Para os propósitos desse trabalho, um breve resumo dos achados até o momento referente às alterações em medula espinal é mostrado na Figura 3.

### Em situações de dor neuropática: com diferentes modelos experimentais

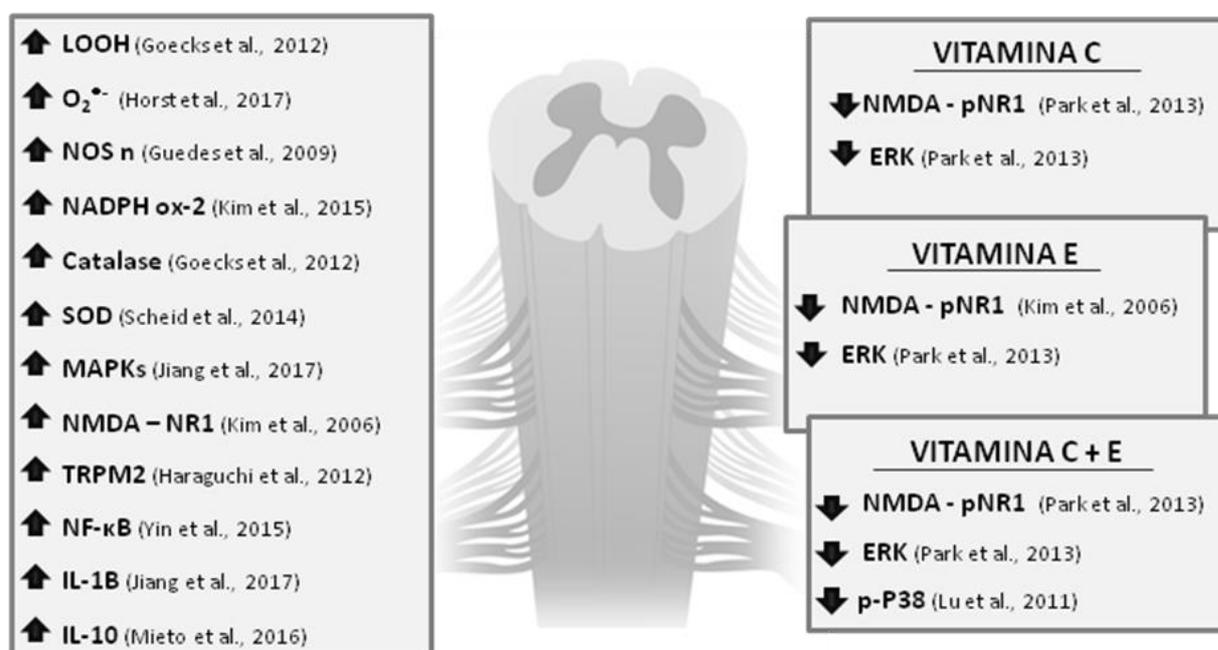


Figura 3: Breve resumo dos efeitos já conhecidos da dor neuropática (à esquerda) e das vitaminas C e E, isoladas e juntas (vitaminas C + E) (à direita), sobre parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo e de sinalização celular em medula espinal. A seta direcionada para cima indica aumento, enquanto aquela para baixo representa redução no parâmetro indicado. À esquerda do parâmetro está a referência do trabalho onde se determinou a alteração. Para descrição da abreviatura, consulte a lista de abreviaturas na página 15 dessa tese (elaborado pela autora).

O envolvimento do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e do ONOO<sup>-</sup> no desenvolvimento da sensibilização associada à dor crônica vem sendo bastante destacado, inclusive sugerindo essas espécies como alvos importantes para novos tratamentos da dor (SALVEMINI et al., 2011; KIM et al., 2015). As NADPH oxidases também parecem contribuir significativamente nas dores inflamatória e neuropática periférica, especialmente a NADPH oxidase tipo 4 (NOX4). Esta enzima parece desempenhar papel importante no estresse oxidativo e nas alterações em citocinas que ocorrem no local da lesão nas fases iniciais após a lesão por CCI (GEIS et al., 2017). Outro parâmetro que sabidamente está alterado na dor neuropática é a GSH, que é reduzida nessa condição (NAIK et al., 2006; BHAT et al., 2016). Postula-se que a redução na GSH possivelmente se deve a sua ação como cofator de outras enzimas, por diretamente atuar como *scavenger* de ROS, e por participar na regeneração do ascorbato (NAIK et al., 2006; COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015; BHAT et al., 2016).

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

Recentemente foi demonstrado que as ROS e RNS atuam como segundos mensageiros capazes de regular a expressão de genes pro-inflamatórios (KOMATSU et al., 2017). Segundo esses autores, as ROS e RNS ativam fatores de transcrição e cascatas de cinases, como as pertencentes à família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a via da proteína cinase B (Akt). Essas moléculas de sinalização intracelular serão abordadas a seguir.

#### **1.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR E DOR**

A sensibilização dos neurônios nociceptivos é modulada por uma variedade de mediadores químicos presentes no espaço extracelular, os quais ativam um grande número de receptores que, por sua vez, ativam diversas cascatas de sinalização intracelular (HUCHO; LEVINE, 2007; POPIOLEK-BARCZYK; MIKA, 2016). Muitos dos avanços recentes no entendimento dos mecanismos envolvidos na dor neuropática se relacionam às vias de sinalização intracelular.

Em situação de lesão periférica ocorre síntese de moléculas mediadoras e fosforilação ou desfosforilação de proteínas, como as pertencentes à família das MAPKs, moléculas de sinalização intracelular com função na regulação da plasticidade neuronal e nas respostas inflamatórias (Figura 3). Dentre as MAPKs, a p38 é normalmente ativada em condições de dor neuropática (JI et al., 2009; LU et al., 2011; POPIOLEK-BARCZYK; MIKA, 2016). Esta proteína é geralmente estimulada em condições de estresse oxidativo e exerce papel importante nas respostas inflamatórias devido às interações diretas e indiretas com o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (THOMPSON; ELDIK, VAN, 2009). Como o NF- $\kappa$ B se liga a

vários sítios promotores no DNA, esse fator pode controlar indiretamente a transcrição de várias moléculas, como as citocinas fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), que contribuem para a sensibilização central (JI et al., 2009; MEACHAM et al., 2017). Os estudos também mostram que a p38 desempenha papel importante na iniciação do processo inflamatório e na regeneração do tecido lesionado, deste modo contribuindo também na recuperação de lesões nervosas (KATO et al., 2013). Ainda, a p38 parece regular o receptor vanilóide de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1), com papel importante na hiperalgesia (JIN et al., 2003).

A p38 é ativada por diversos fatores, como exemplo alterações no estado redox da célula e na relação tióis/dissulfetos (ALLEN; TRESINI, 2000; DROGE, 2002; SON et al., 2011). Em situações de dor, a p38 está ativada principalmente em microglia (JI et al., 2009). A microglia ativada secreta mediadores pró-inflamatórios e pró-nociceptivos, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18, os quais interagem com neurônios e, assim, modulam a transmissão sináptica e o estado de dor (BERTA et al., 2016; POPIOLEK-BARCZYK; MIKA, 2016; ZHAO, et al 2017). A administração de inibidores de MAPKs diminui a hiperalgesia e a alodinia em modelos de dor neuropática (NI et al., 2016).

Outra proteína de sinalização ativada em condições de dor é a Akt, uma serina treonina cinase envolvida em diversas vias de transdução de sinal, como as relacionadas a fatores de crescimento, citocinas e a receptores de glutamato. Suas funções se relacionam principalmente a regulação do metabolismo, crescimento, proliferação e sobrevivência celular (POPIOLEK-BARCZYK; MIKA, 2016; GUO et al., 2017). A cascata de eventos intracelulares se inicia com a ativação do fosfatidil inositol-3-cinase (PI3K), seguida pelo aumento de fosfatidilinositol-trifosfato (PIP3), que leva a translocação e ativação da Akt. Esta última possui inúmeros efetores, como a mTOR (proteína alvo da rampamicina), a qual atua como reguladora da sensibilidade dos nociceptores na dor neuropática (OBARA et al., 2011; POPIOLEK-BARCZYK; MIKA, 2016; GUO et al., 2017). A via PI3K/Akt também modula a informação nociceptiva e medeia a sensibilização central induzida por estímulos nocivos (SUN; YAN; WILLIS, 2007; XU, et al., 2007; POPIOLEK-BARCZYK; MIKA, 2016; LIU; REN, 2017).

A ativação da via PI3K/Akt/mTOR desempenha papel importante na ativação da microglia. Em ratos com CCI, essa via parece participar no desenvolvimento da dor neuropática (GUO et al., 2017). Segundo esses autores, a inibição da via PI3K/Akt/mTOR atenuou a hiperalgesia e paralelamente inibiu a ativação da microglia na medula espinal de ratos com CCI. A ativação da Akt parece também aumentar a sensibilidade das células ao

estresse metabólico e, assim, torná-las mais susceptíveis a morte celular mediada por ROS (ZHAO et al., 2017). Em animais com dor neuropática, o aumento da Akt fosforilada (p-Akt) ocorreu paralelamente ao incremento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que sugere o envolvimento da Akt nessa condição dolorosa (GUEDES et al., 2008). Um estudo recente sugeriu que as ROS e RNS podem ativar as vias da PI3K/Akt, p38 e NF-κB, e que o uso de antioxidantes pode prevenir a ativação destas vias em modelo de dor inflamatória (KOMATSU et al., 2017).

### 1.5 ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C) E α-TOCOFEROL (VITAMINA E)

Como destacado anteriormente, as ROS e RNS desempenham papel importante na dor neuropática. Por este motivo, alguns estudos sugerem a administração de compostos com propriedades antioxidantes como uma alternativa para atenuação dessa dor (KIM et al., 2010; GRACE et al., 2016). Porém, ainda se desconhece o efeito de compostos com ação antioxidante sobre muitos dos mecanismos envolvidos na dor neuropática.

O ácido ascórbico (vitamina C) e o α-tocoferol (vitamina E) são nutrientes essenciais que atuam como antioxidantes (LU et al., 2011). Essas moléculas também estão envolvidas em diversas outras funções biológicas (WAWRZYNIAK et al., 2013), muitas das quais serão abordadas ainda nesse item. A ingestão de vitamina C e vitamina E é bem aceita na população e a aquisição das mesmas se dá por um custo relativamente baixo (TRABER; STEVENS, 2011).

A vitamina E é a denominação genérica de uma mistura de tocoferóis e tocotrienóis. O tocoferol possui quatro isômeros – α, β, γ e δ – que se distinguem por diferenças estruturais que determinam sua atividade biológica. O α-tocoferol é o isômero biologicamente mais ativo (BUTTERFIELD et al., 2002; RIMBACH; MINIHANE, 2002) e o mais abundante em alimentos (TRABER, 2007). A vitamina E é um elemento nutricional, considerado um antioxidante natural efetivo no organismo devido às suas características de lipossolubilidade (RIZVI et al., 2014; GALLI et al., 2017) e por sua abundância nas membranas biológicas (HEYDARI; AHMADIZADEH; AHMADI ANGALI, 2016). Como suplementação, recomenda-se a ingestão média de 15 mg/dia de α-tocoferol para ambos os sexos, não ultrapassando a dosagem máxima de 1g/dia (KRINSKY et al., 2000; GALLI et al., 2017). De acordo com AZZI et al. (2016), o α-tocoferol é o componente da vitamina E que é eficientemente absorvido e disponibilizado em quantidades significativas no organismo após

sua absorção. Os demais componentes da vitamina E também possuem atividade antioxidante, porém são rapidamente eliminados do corpo após sua absorção.

O  $\alpha$ -tocoferol é essencial para inúmeras funções no organismo, incluindo desenvolvimento normal e proteção do sistema nervoso (HILL et al., 2003; GALLI et al., 2017). Em ratos, a suplementação com  $\alpha$ -tocoferol provocou rápido aumento na concentração desta vitamina no SNC (BETTI et al., 2011; GALLI et al., 2017). A vitamina E, incluindo o  $\alpha$ -tocoferol, atuou como um potente agente antioxidante na recuperação da lesão mitocondrial provocada por aumento no estresse oxidativo; ela também melhorou a capacidade de sobrevivência de astrócitos após toxicidade induzida por glutamato (SELVARAJU et al., 2014). O  $\alpha$ -tocoferol foi ainda capaz de neutralizar o  $\text{ONOO}^-$  em hipocampo (WOLF, 2009) e de prevenir, no tecido nervoso, o aumento na concentração intracelular de cálcio e a formação de ROS induzida pela ativação glutamatérgica (TIROSH et al., 2000). Em ratos com dor neuropática, a administração de vitamina E provocou antinocicepção e diminuiu a fosforilação da subunidade NR1 do receptor NMDA, receptor esse que parece desempenhar papel importante na transmissão da informação nociceptiva persistente (KIM et al., 2006). A suplementação com vitamina E foi também capaz de reduzir a hiperalgesia térmica e mecânica em modelos de dor crônica (KIM, et al., 2006; TIWARI; KUHAD; CHOPRA, 2009; MEYMANDI et al., 2017;). Ainda, a vitamina E parece regular sistema imune e processos inflamatórios (RIZVI et al., 2014), vias de transdução de sinal intracelular e expressão gênica, como a via da Akt (HUANG et al., 2013; AZZI et al., 2016), e MAPK como a proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) (PARK et al., 2013).

Nas membranas lipídicas, a ação protetora do  $\alpha$ -tocoferol ocorre principalmente pela prevenção da formação de hidroperóxidos lipídicos. Isto se dá por meio da doação de um hidrogênio para o radical peroxil, o que resulta na estabilização deste radical e na redução do  $\alpha$ -tocoferol para  $\alpha$ -tocoferoxil (FANG; YANG; WU, 2002). Contudo, o  $\alpha$ -tocoferol existe em baixas concentrações na membrana lipídica, em torno de 1 molécula de  $\alpha$ -tocoferol para 2000 a 3000 moléculas de fosfolipídeos (RIMBACH; MINIHANE, 2002; RIZVI et al., 2014). A depleção de  $\alpha$ -tocoferol é muito rápida, o que torna necessária a regeneração dessa molécula por meio da ação conjunta de outros antioxidantes presentes na porção hidrossolúvel da célula, como o ascorbato. A regeneração do  $\alpha$ -tocoferol e do ascorbato são ilustradas, de forma esquemática, na Figura 4.

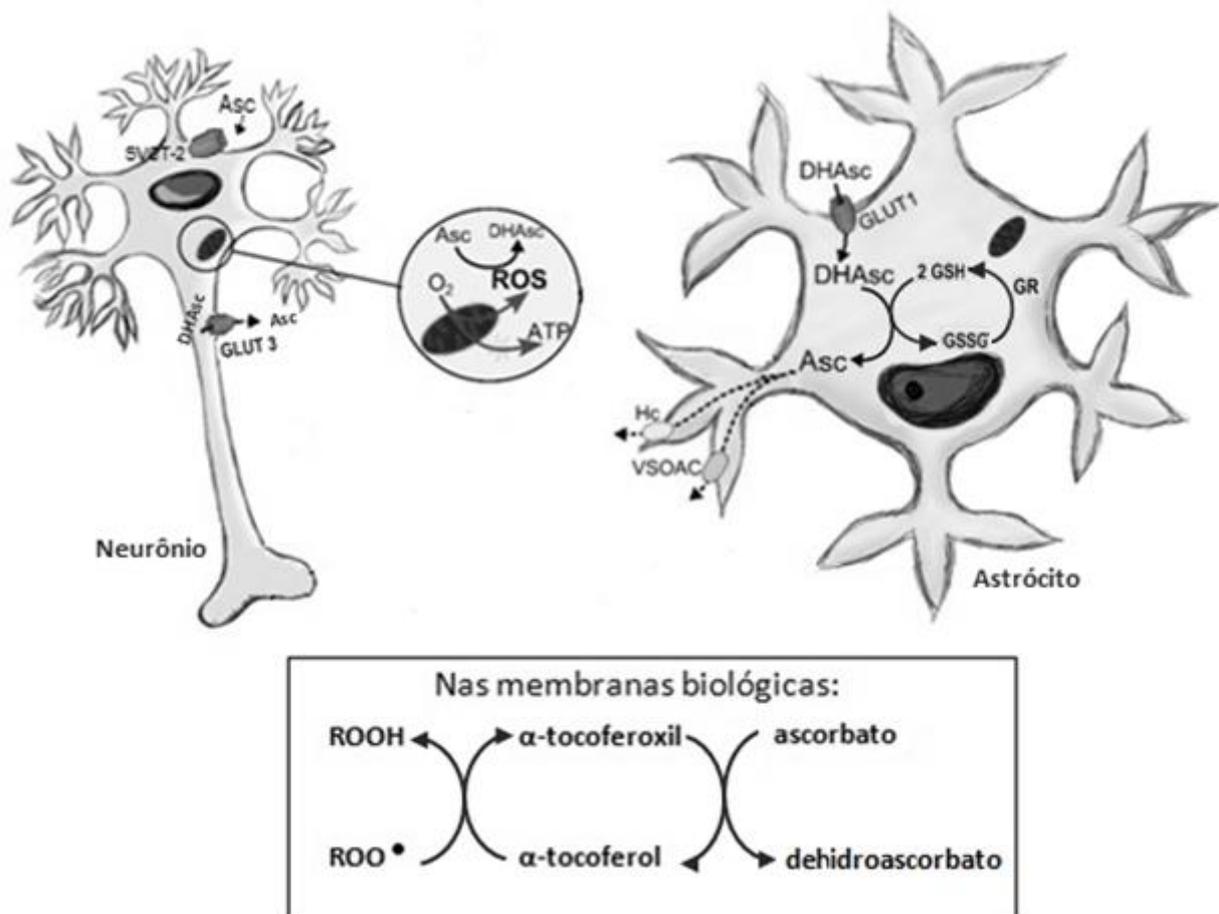


Figura 4: Esquema mostrando a regeneração do ascorbato e do  $\alpha$ -tocoferol (retângulo) em células do sistema nervoso central. O  $\alpha$ -tocoferol é regenerado da sua forma radicalar nas membranas biológicas, por meio da ação do ascorbato, o qual é oxidado neste processo a dehidroascorbato. O dehidroascorbato é captado pelos astrócitos, por meio de GLUT1 e regenerado a ascorbato por meio de reação direta com a glutatona. O ascorbato é transportado para o meio extracelular onde pode ser captado pelos neurônios, onde exerce inúmeras ações, dentre elas sua função antioxidante. DHAsc: dehidroascorbato; Asc: Ascorbato; GLUT1: Transportador de Glicose do tipo 1; GLUT3: Transportador de glicose do tipo 3; SVCT-2: do inglês *sodium-dependent vitamin C transporter 2*; GSSG: Glutaciona oxidada; GSH: Glutaciona reduzida; GR: Glutaciona redutase; VSOAC: canais de ânions orgânicos sensíveis a volume Hc: Hemiconexinas ATP: Adaptado de Covarrubias Pinto et al., (2015).

O ascorbato é a forma reduzida do ácido ascórbico e a que predomina no plasma e no meio intracelular. Ele é hidrossolúvel, desempenha diversas funções biológicas (AL-REJAIE et al., 2012) e é considerado um antioxidante rapidamente disponível às células (ZHOU; CHEN, 2012). A suplementação com ácido ascórbico aumenta a concentração de ascorbato no organismo, e esse atua no sistema imune (AL-REJAIE et al., 2012); na absorção de ferro; como um agente redutor e cofator de enzimas, por exemplo, enzimas que participam na síntese de colágeno e catecolaminas (HARRISON; MAY, 2009; COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015). O ascorbato também participa na síntese de neurotransmissores e hormônios peptídicos, e na regulação de fatores de transcrição e expressão gênica (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; CARR; MCCALL, 2017;). Segundo Krinsky et al. (2000), a dose diária

recomendada de ácido ascórbico é 90 mg/dia para homens, e 75 mg/dia para mulheres. A dosagem máxima é 2 g/dia para ambos os sexos. Um aspecto importante do ácido ascórbico é seu comportamento pró-oxidante quando o mesmo é utilizado em altas doses. Isso ocorre porque o ascorbato participa na reação de Fenton, a reação onde o  $H_2O_2$  reage com ferro ou cobre produzindo radical  $OH^\bullet$ . Assim, recomenda-se a utilização de baixas doses de ácido ascórbico a fim de evitar superdose e oxidação de moléculas (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012).

De modo geral, a maior concentração de ascorbato no organismo está no SNC, principalmente nas regiões superiores do neuroeixo (RICE, 2000; HAN, et al., 2007;). A maioria do ascorbato presente no SNC é de origem plasmática, mesmo nos animais que sintetizam seu próprio ascorbato, como os ratos (RICE, 2000). A entrada de ascorbato no SNC ocorre mediante atividade do transportador de vitamina C dependente de sódio do tipo 2 (SVCT-2, do inglês *sodium-dependent vitamin C transporter 2*), que é encontrado no plexo coriódico e na membrana plasmática de neurônios. Os neurônios são altamente sensíveis ao dano oxidativo e pode acumular ascorbato em concentrações 10 vezes superiores a do meio extracelular (REBEC, 1994; RICE; RUSSO-MENNA, 1998). No neurônio, o ascorbato atua como uma importante molécula antioxidante, como um neuromodulador de atividade sináptica (HARRISON; MAY, 2009) e na troca metabólica dos neurônios durante condições de atividade e repouso, entre outras funções (COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015).

O ascorbato é um excelente redutor, e quando atua como antioxidante é oxidado a dehidroascorbato. Para manter o equilíbrio redox e proteger os neurônios de danos oxidativos, é necessário realizar a reciclagem do ascorbato. Essa reciclagem ocorre nos astrócitos, de forma dependente de glutatona e de outros tióis celulares e mediante a utilização de NADPH (ALMEIDA et al., 2001; JOVANOVIĆ et al., 2014; COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015). O transporte de dehidroascorbato para os astrócitos é realizado pelos transportadores de glicose dos tipos 1 e 3 (GLUT 1 e GLUT 3) (MAY, 2012; COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015). O transporte de ascorbato entre neurônios e astrócitos parece se relacionar com as concentrações extracelulares de glutamato. O aumento de glutamato no meio extracelular sinaliza a liberação de ascorbato pelo astrócito (RICE, 2000; COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015).

Alguns estudos mostram que a administração de ácido ascórbico reduz a sensação dolorosa. Em modelos de dor, a administração de ácido ascórbico, em baixas doses, promoveu antinocicepção (ROSA et al., 2005), reduziu a fosforilação da subunidade NR1 do receptor NMDA, e diminuiu a proteína ERK, a qual possui papel importante na dor (PARK et al.,

2013). A administração venosa de ácido ascórbico também reduziu a dor em pacientes com herpes zoster (KIM et al., 2016), com neuralgia pós-herpética (CHEN et al., 2009) e com câncer em estágio avançado (STEPHENSON et al., 2013). Dados epidemiológicos indicam a existência de associação entre dor e redução nos valores plasmáticos de vitamina C (CARR; MCCALL, 2017; DIONNE et al., 2016).

Na literatura também há estudos onde se fez administração conjunta de vitaminas C e E em ratos em condição que sabidamente induz nocicepção (LU et al., 2011; PARK et al., 2013). Nesses estudos, a administração conjunta das vitaminas atenuou a nocicepção (LU et al., 2011; PARK et al., 2013), reduziu a fosforilação da subunidade NR1 do receptor NMDA (PARK et al., 2013) e diminuiu as proteínas ERK (PARK et al., 2013) e p38 fosforilada (p-p38) (LU et al., 2011). Contudo, esses estudos foram realizados em modelos de dor inflamatória e dor neuropática, essa última induzida por modelos de isquemia/reperfusão em articulação de uma das patas posteriores, e de lesão poupadora de nervo. É sabido que cada modelo animal para o estudo da nocicepção se baseia em uma metodologia específica para a indução do quadro doloroso, e os resultados variam amplamente com pequenas alterações na indução da nocicepção (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Segundo esses autores, é essencial que dados de diferentes modelos animais para o estudo da dor sejam relatados e interpretados no contexto específico daquele modelo de dor. Ainda, na literatura há um número limitado de estudos que abordam os efeitos da suplementação com vitaminas C e E no tecido nervoso de indivíduos com dor (para revisão, ver Figura 3). Assim, a motivação para o presente estudo foi a escassez de dados, a falta de estudos abordando os efeitos da suplementação de vitaminas C e E em ratos com CCI, o fato da ingestão dessas vitaminas ser aparentemente seguro e bem aceito pela população, e por as mesmas se apresentarem como potenciais candidatos para o tratamento da dor neuropática. Acredita-se que os dados do presente estudo não apenas ampliará o conhecimento dos efeitos da suplementação com vitaminas C e E sobre a medula espinal, mas também reforçará o possível uso terapêutico futuro dessas vitaminas no tratamento da dor neuropática.

---

## 2. HIPÓTESE

Como a vitamina C e a vitamina E são moléculas antioxidantes que aparecem como possíveis candidatas para tratar dor, espera-se que a administração intraperitoneal dessas vitaminas, isoladas e juntas, em doses baixas, reduza as sensibilidades mecânica e térmica aumentadas pela CCI, um modelo de dor neuropática. Espera-se também que o tratamento induza melhora no IFI, uma medida de recuperação motora pós-lesão nervosa. Paralelamente, espera-se que a administração das vitaminas C e E provoque mudanças em parâmetros oxidativos e nitrosativos em medula espinal lombossacral e nervo isquiático lesionado, e que as alterações sejam em direção oposta àquelas desencadeadas pela CCI. Da mesma forma, espera-se que as vitaminas modifiquem as expressões do transportador SVCT-2 e de proteínas de sinalização intracelular que sabidamente estão ativadas em condição de dor neuropática, como a p38 e a Akt, e que essas alterações também sejam opostas às induzidas pela CCI. De modo geral, espera-se que os resultados desse estudo tragam mais subsídios ao entendimento do efeito antinociceptivo das vitaminas C e E, e que reforce a indicação dessas vitaminas para tratar dor neuropática.

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração de vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), isoladas ou juntas (vitaminas C+E), sobre parâmetros nociceptivo, de estresse oxidativo e nitrosativo, e vias de sinalização intracelular em medula espinal lombossacral de ratos com dor neuropática induzida por CCI, realizando as análises nos períodos de 3 e 10 dias após a intervenção cirúrgica para determinar os efeitos temporais do tratamento.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar os efeitos da administração de vitamina C (30mg/kg/dia) e vitamina E (15mg/kg/dia), por 3 e 10 dias, isoladas ou juntas, em ratos submetidos à manipulação e CCI no nervo isquiático direito, mediante avaliação de:

a) Parâmetros nociceptivos e de recuperação funcional do nervo isquiático, mediante o uso de testes de sensibilidades mecânica e térmica, e índice funcional do nervo isquiático (IFI), para avaliar o efeito antinociceptivo do tratamento; a duração do efeito antinociceptivo; o efeito da administração do tratamento utilizando via oral ou intraperitoneal; e ainda, avaliar o uso da co-administração de vitamina C e E com gabapentina.

b) Parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático lesionado, pela determinação dos valores de hidroperóxidos lipídicos e da capacidade antioxidante total (TAC), a fim de avaliar o efeito local do tratamento sobre estes parâmetros.

c) Parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo no segmento lombossacral da medula espinal, mediante determinação da formação de  $O_2^{\bullet-}$ , valores de  $H_2O_2$ , metabólitos do NO, hidroperóxidos lipídicos, tióis totais, ácido ascórbico e TAC nesse tecido;

d) Proteínas de sinalização intracelular no segmento lombossacral da medula espinal, pela determinação da expressão da p-p38, p-Akt, Akt, e do transportador SVCT-2;

3.2.2 Avaliar os efeitos da administração de vitamina C (30mg/kg/dia) e vitamina E (15mg/kg/dia), isoladas ou juntas, em animais sem manipulação cirúrgica, tratados por 10 dias, a fim de determinar a possível toxicidade do tratamento. Para isto, foram avaliados parâmetros indicadores de função hepática e renal, mediante a determinação de:

a) Atividade da Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Gama glutamiltranspeptidase (Gama GT), bilirrubina direta, bilirrubina total e creatinina, em plasma;

b) Atividade da Glutathione-s-transferase (GST), TAC e hidroperóxidos lipídicos, no fígado;

c) Morfologia dos hepatócitos, pela técnica histológica de hematoxilina e eosina.

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS: PROCEDÊNCIA E MANUTENÇÃO

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (#23352-ANEXO I), foram solicitados ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) ratos da linhagem *Wistar*, machos, com peso de 200-250g e 60 dias de vida. Os animais foram mantidos no ratário do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, acomodados em caixas criadouros forradas com maravalha, com livre acesso à água e alimentação, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 07h00min às 19h00min) e temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C. A limpeza das caixas foi realizada, no máximo, a cada dois dias. O transporte dos animais para o Laboratório de Neurobiologia Comparada ocorreu nos dias dos testes de sensibilidade dolorosa, da cirurgia e/ou morte.

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos nos grupos experimentais descritos a seguir e mostrados na Figura 5:

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

Os animais destes grupos experimentais receberam um dos tratamentos listados abaixo, de acordo com o objetivo do experimento realizado. A descrição completa do tratamento é apresentada no item 4.4 "Tratamento com solução veículo e de vitaminas C e E".

- Solução veículo: solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% ou água de beber, ambas acrescidas de Tween 80 a 1% e administradas por 3 ou 10 dias;
- $\alpha$ -tocoferol (vitamina E - 15mg/kg), administrada por 3 ou 10 dias ;

- Ácido ascórbico (vitamina C - 30mg/kg), administrada por 3 ou 10 dias;
- $\alpha$ -tocoferol (15mg/kg)+ácido ascórbico (30mg/kg) (vitaminas C+E), administradas por 3 ou 10 dias.

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação 3 e 10 dias após o início do tratamento, para a obtenção do nervo isquiático direito, do segmento lombossacral da medula espinal, de amostra do fígado e de plasma. Cada grupo experimental foi composto por seis (06) animais, o que totalizou 144 ratos usados no estudo.

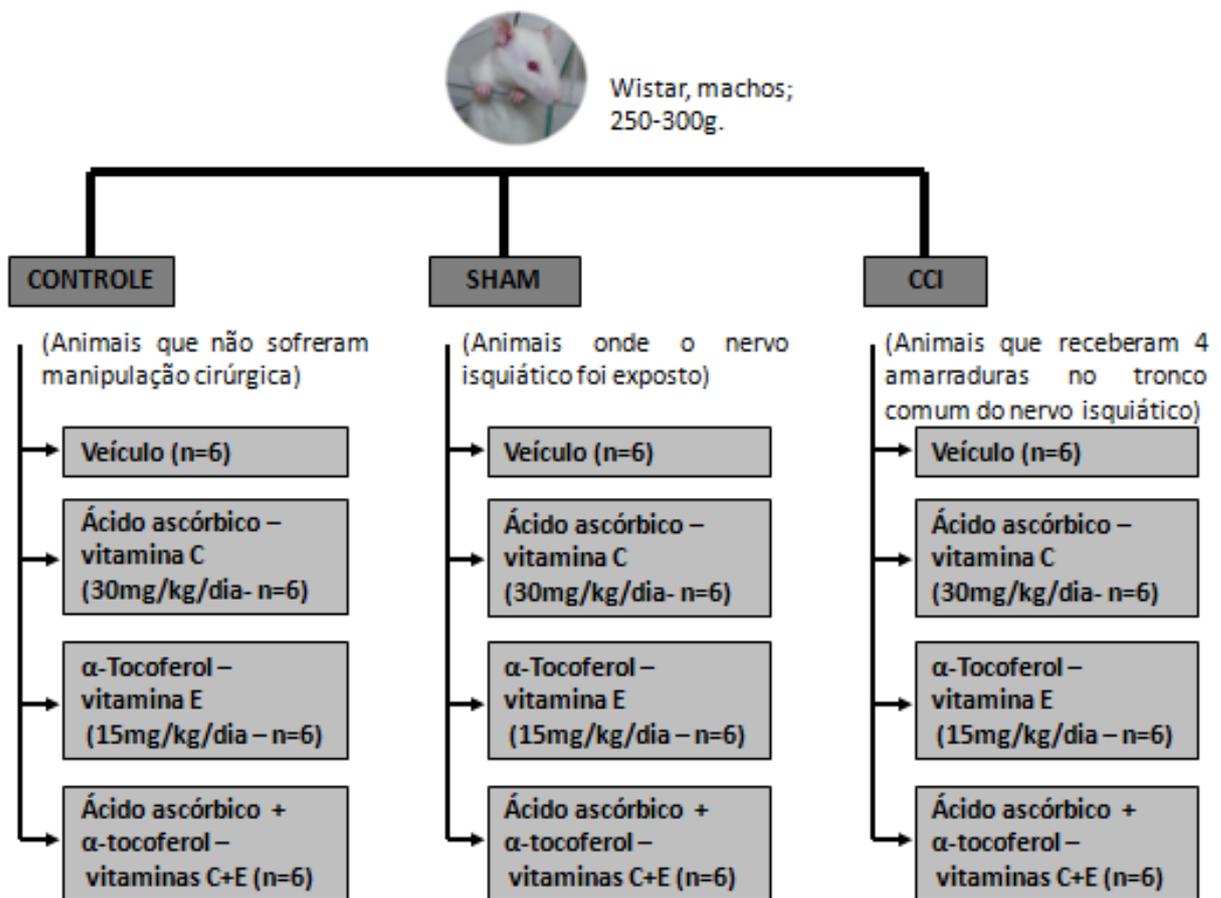


Figura 5 : Esquema mostrando os grupos experimentais e os tratamentos usados na pesquisa.

### 4.3 CONSTRIÇÃO NO NERVO ISQUIÁTICO

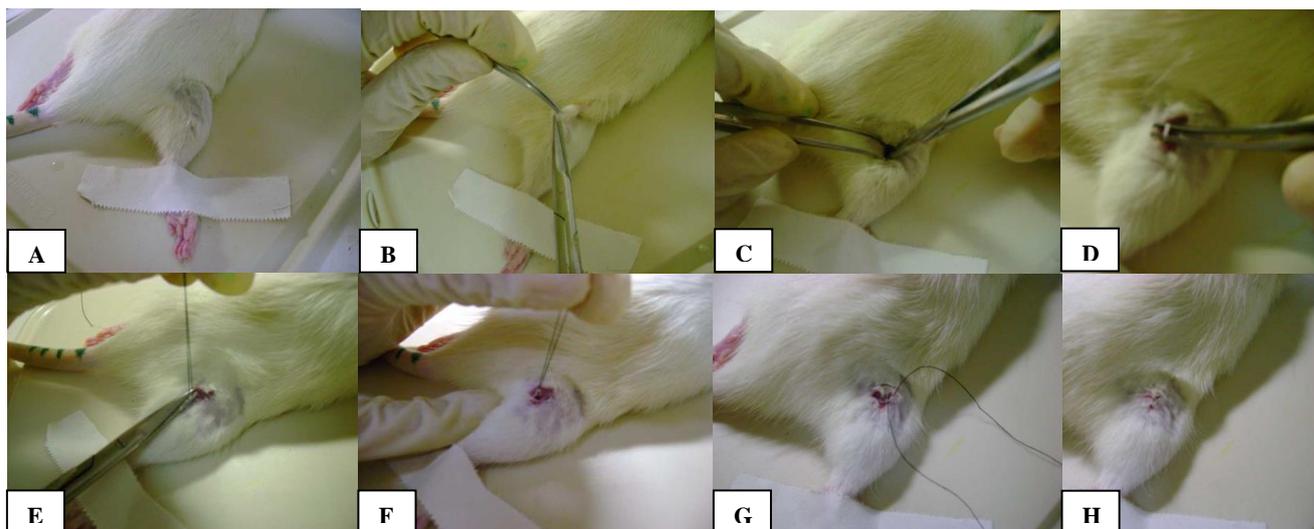
O procedimento de constrição no nervo isquiático foi realizado segundo a técnica descrita por BENNETT & XIE (1987), com algumas modificações (HORST et al., 2014). De forma resumida, os ratos foram inicialmente anestesiados com solução mista de quetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Após anestesia, o rato foi

posicionado em decúbito dorsal para a realização da tricotomia da coxa direita (Figura 6 A). A intervenção foi iniciada pela assepsia da pele com álcool iodado 2%, seguida de incisão cutânea e subcutânea longitudinal na região do terço médio da coxa (Figura 6 B). Nos ratos do grupo sham, o nervo isquiático foi apenas visualizado e manipulado (Figura 6 D). Nos animais do grupo CCI, o nervo isquiático recebeu 4 amarraduras com fio de sutura *catgut* cromado 4.0 tipo c bioabsorvível (Shalon) em seu tronco comum, sendo a distância entre os nós cerca de 1 mm (Figura 6 E,F). Assim, o comprimento do nervo afetado foi de aproximadamente 7,0 mm. O grau de constrição usado retarda, mas não interrompe totalmente a circulação sanguínea da superfície epineural.

Após a manipulação ou constrição no nervo isquiático, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível 4.0 (Somerville) e o antimicrobiano rifamicina (Rifocina Spray® 10 mg/mL, 1 jato) foi aplicado sobre a pele suturada (Figura 6 G,H). Os animais do grupo controle não sofreram intervenção cirúrgica.

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

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acomodados nas caixas com maravalha e mantidos em observação no Laboratório de Neurobiologia até a recuperação da anestesia. Neste período, os ratos receberam alimento e água *ad libidum*. Após a recuperação total da anestesia, os ratos receberam a primeira administração de solução veículo ou de vitaminas C (30mg/kg/dia), E (15 mg/kg/dia) ou C+E (vitaminas C e E em conjunto, nas mesmas doses), a ser descrito no item 4.4 "Tratamento com solução veículo e de vitaminas C e E". Em seguida, os ratos foram levados ao ratário, onde permaneceram até o dia da morte, recebendo durante o período experimental tratamento diário com as soluções veículo ou de vitaminas, de acordo com o grupo experimental a que pertencia. Os ratos não receberam nenhuma terapia analgésica para que os efeitos da lesão nervosa e tecidual não fossem mascarados por influências externas ao tratamento. Os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas no item 4.1 "Animais: Procedência e Manutenção".



**Figura 6:** As fotografias mostram a sequência dos procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos. (A) Pata posterior direita de um rato em posição de decúbito dorsal mostrando a tricotomia na região média da coxa. (B) Início da incisão do tecido cutâneo na região média da coxa direita de um rato. (C) Processo de afastamento dos músculos bíceps femural e semitendinoso na região média da coxa direita de um rato. (D) Exposição do tronco comum do nervo isquiático na região média da coxa direita de um rato. (E) Realização do primeiro nó no tronco comum do nervo isquiático direito. (F) Realização do quarto nó no tronco comum do nervo isquiático direito. (G) Início da sutura do tecido cutâneo na região média da coxa direita de um rato. (H) Pata direita de um rato mostrando a sutura na região média da coxa (Elaborado pela autora).

#### 4.4 ADMINISTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES VEÍCULO E DE VITAMINAS C E E

No estudo foi usado ácido ascórbico (vitamina C - Sigma) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), esta última na forma de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (Sigma), escolhida entre os demais componentes da vitamina E pela sua alta atividade biológica. Para as administrações, a vitamina C e a vitamina E foram diluídas em veículo (solução salina, para as administrações i.p., ou água de beber, para as administrações por via oral, ambas acrescidas de Tween 80 na diluição de 1%). O preparo das soluções se deu sempre no momento de sua utilização, e durante o preparo o frasco foi protegido da luz.

Nos experimentos onde a via de administração das soluções foi i.p., os ratos receberam injeções diárias, que se iniciou no dia da intervenção cirúrgica (dia 0), após a completa recuperação dos efeitos da anestesia. Assim, a administração das soluções se iniciou ao final da tarde do dia da cirurgia para o isolamento do nervo isquiático. Nos dias seguintes, a administração continuou sempre no mesmo horário daquele do primeiro dia, ou seja, ao final da tarde. Nos animais do grupo controle, as administrações também tiveram início no dia zero, ao fim da tarde, e seguiu o mesmo protocolo daquele dos animais com intervenção

cirúrgica. As administrações tiveram duração de 3 dias, no grupo de ratos mortos aos 3 dias, e 10 dias no grupo de animais mortos aos 10 dias após a intervenção cirúrgica.

Nos experimentos onde a via de administração das vitaminas C+E foi oral, os ratos receberam as vitaminas diluídas na água de beber, com a administração tendo início após o procedimento cirúrgico e passados os efeitos da anestesia. As vitaminas foram preparadas a cada 12 horas e oferecidas aos ratos em garrafas de vidro envolvidas em papel alumínio, para proteção das vitaminas dos efeitos da luz. Para cálculo da dose de vitaminas C+E a ser administrada a cada rato, realizou-se um experimento piloto para determinação do volume médio diário de água ingerido pelos ratos. Durante todo o período experimental se monitorou a ingestão hídrica dos ratos para controle da quantidade de solução ingerida em cada caixa moradia.

Deve ser destacado que a escolha da administração das vitaminas após a recuperação dos efeitos da anestesia foi uma tentativa de iniciar o tratamento em período inicial da dor neuropática, uma vez que é sugerido que cada dia da vida do rato corresponde a 30 dias da vida de um humano (ANDREOLLO et al., 2012). A escolha também se deve aos conhecimentos de que ocorreu diminuição na concentração plasmática de vitamina C após cirurgia (KIABI et al., 2013) e que a administração dessa vitamina reduziu rapidamente a sensação dolorosa em pacientes com herpes zoster (BYUN et al., 2011). A escolha se baseou ainda no fato de que não há estudos mostrando os efeitos dos tratamentos com vitaminas C e E nas condições propostas nessa pesquisa.

## **4.5 PARÂMETROS NOCICEPTIVOS**

### **4.5.1 Determinação do limiar mecânico**

Para avaliação da sensibilidade mecânica se determinou o limiar de resposta da pata direita (ipsilateral à lesão nos ratos com lesão tecidual ou nervosa), mediante utilização do aparelho de von Frey eletrônico (Insight, Brasil). Para a realização do teste, os ratos foram colocados individualmente em caixas de vidro (12x20x20 cm) apoiadas sobre uma superfície elevada e revestida por tela metálica. Neste ambiente, os animais foram aclimatados por 20 minutos. O teste consistiu na aplicação de forças crescentes na região plantar da pata posterior direita do animal. A resposta foi considerada positiva quando o rato realizou o movimento de retirada da pata estimulada durante o teste. Neste momento, a intensidade da pressão exercida

foi automaticamente registrada pelo aparelho. Porém, a resposta foi desconsiderada se seguida de caminhada. Neste caso, o teste foi refeito. O teste foi repetido cinco vezes, uma vez a cada 30 s, no mesmo animal e na pata ipsilateral à lesão. A média das cinco leituras foi considerada como o limiar de resposta do animal em experimentação. O teste foi realizado sempre pela mesma pessoa, em ambiente silencioso e ao início da manhã.

Nos experimentos para avaliação do efeito antinociceptivo das vitaminas administradas i.p., os testes foram realizados antes do procedimento cirúrgico (dia 0) e aos 3 dias, no grupo que recebeu tratamento por 3 dias, e aos 3, 5, 7, e 10 dias no grupo tratado por 10 dias. Nos experimentos que avaliaram os efeitos da administração por via oral das vitaminas C+E, a avaliação da sensibilidade mecânica ocorreu antes do procedimento cirúrgico (dia 0) e ao final do período de tratamento (3 dias e 10 dias). Nos experimentos para avaliação da duração do efeito antinociceptivo das vitaminas C, E e C+E, os testes de von Frey foram realizados diariamente, começando após o término das administrações das vitaminas por 3 e 10 dias e seguindo até a ausência da resposta antinociceptiva.

Os resultados do teste de von Frey foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média das respostas pré e pós-lesão dos ratos nos períodos considerados.

#### **4.5.2 Determinação do limiar térmico**

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

Os testes foram realizados sempre em ambiente silencioso, no início da manhã e pela mesma pessoa. Da mesma forma que no testes de sensibilidade mecânica, nos experimentos para avaliação do efeito antinociceptivo das vitaminas administradas i.p., os testes foram realizados antes do procedimento cirúrgico (dia 0) e aos 3 dias, no grupo que recebeu tratamento por 3 dias, e aos 3, 5, 7, e 10 dias no grupo tratado por 10 dias. Nos experimentos que avaliaram os efeitos da administração por via oral das vitaminas C+E, a avaliação da

sensibilidade mecânica ocorreu antes do procedimento cirúrgico (dia 0) e ao final do período de tratamento (3 dias e 10 dias). Nos experimentos para avaliação da duração do efeito antinociceptivo das vitaminas C, E e C+E, os testes de von Frey foram realizados diariamente, começando após o término das administrações das vitaminas por 3 e 10 dias e seguindo até a ausência da resposta antinociceptiva

Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média da latência da resposta dos ratos.

#### 4.5.3 Determinação do índice funcional do isquiático

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

No teste, o animal foi colocado em um corredor de madeira (8,5x100 cm) com acesso a um ambiente escuro. O chão do corredor foi forrado com uma tira de papel branco da mesma medida e o rato a ser testado teve suas patas traseiras marcadas com tinta preta. A seguir, o animal foi solto no início do corredor por onde pode se locomover em direção ao ambiente escuro, ao final do corredor, deixando impressas as marcas de suas patas traseiras. Todos os animais foram anteriormente treinados com três passagens pelo corredor, permitindo a adaptação e exploração do local. Foram selecionadas para análise as pegadas com qualidade e clareza de impressão (Figura 6), sendo aferidas as patas operada (direita) e contralateral (esquerda). As aferições foram feitas sempre pelo mesmo examinador e o Índice Funcional do Isquiático (IFI) foi calculado conforme a fórmula abaixo:

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

A pata esquerda, ou normal, corresponde à letra N; a pata lesionada, ou experimental, à letra E. Foram realizadas as medidas: da extensão da pegada (PL: distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), da largura da pegada (TS: distância entre o 1º e 5º dedo), e da distância entre os dedos intermediários (IT: 2º e 4º dedo) das patas traseiras (Figura 7). Os valores obtidos por esta fórmula foram considerados como um índice da condição funcional do nervo isquiático, expresso em déficit funcional. Variações de 0 a ±11 estão nos desvios de normalidade da pegada. O zero representa função normal e o -100 representa perda total da função. Os valores intermediários correspondem a déficits parciais de função. Os testes foram

realizados nos dias 3 e 10 após a cirurgia, no primeiro horário da manhã, pelo mesmo experimentador.

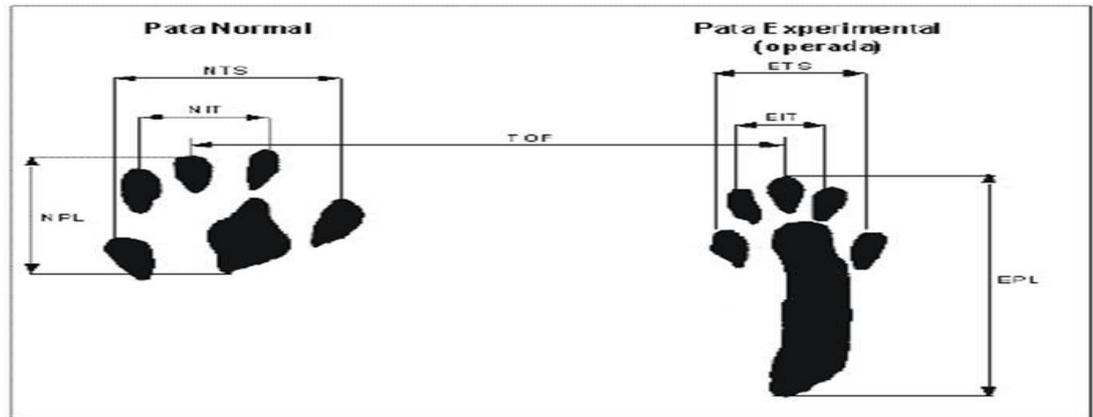


FIGURA 7: Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Isquiático (IFI). N: normal; E: experimental (operada); TS: abertura total dos dedos (1° a 5°); IT: abertura dos dedos intermediários (2° ao 4°); PL: comprimento da pegada (Adaptado de Monte-raso et al., 2006).

Para facilitar o entendimento do leitor, a Figura 8 mostra linha temporal da realização dos testes de sensibilidade dolorosa (testes de von Frey eletrônico, da placa quente e IFI). Nela é mostrada ainda as datas da realização da cirurgia, o dia da morte dos ratos para a coleta dos tecidos usados nas determinações bioquímicas do estudo, e os dias da administração i.p. das vitaminas C, E e C+E.

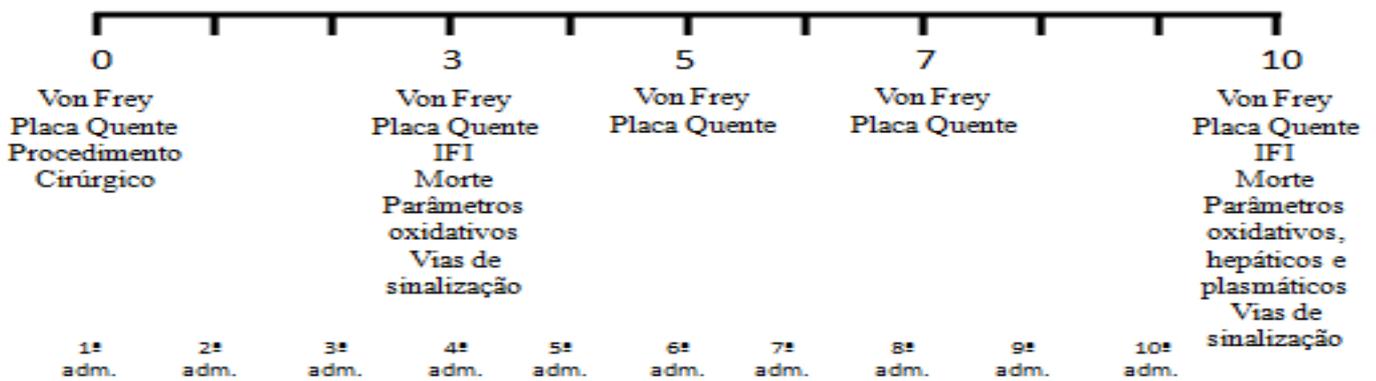


Figura 8 – Esquema temporal mostrando os dias das avaliações das sensibilidades mecânica e térmica (testes de von Frey e placa quente, respectivamente), da avaliação do índice funcional do nervo isquiático (IFI), da realização do procedimento cirúrgico, morte e coleta dos tecidos e plasma para as dosagens dos parâmetros oxidativos, hepáticos e plasmáticos, e das vias de sinalização abordados nesse estudo. A linha do tempo se refere especialmente aos experimentos realizados para avaliar o efeito antinociceptivo das administrações i.p. das soluções. Adm: administração das soluções veículo e vitaminas C, E e C+E.

## 4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após o período experimental, os animais foram mortos por decapitação e imediatamente retirados os tecidos a seguir: fígado, que foi dividido em duas partes, uma para análises de parâmetros oxidativos e outra para análise morfológica dos hepatócitos; nervo isquiático lesionado (direito); e o segmento lombossacral da medula espinal. Este último foi dividido em três partes. Uma das partes foi utilizada para a determinação dos valores de  $O_2^{\bullet-}$ . A segunda parte foi usada para a determinação dos valores de  $H_2O_2$ . Essas duas partes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas intactas à temperatura de  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . A terceira parte da medula espinal foi homogeneizada e usada para a dosagem dos parâmetros oxidativo e nitrosativo, e expressão de proteínas. A homogeneização desta parte da medula espinal, assim como da parte do fígado destinada a determinação de parâmetros oxidativos e o nervo isquiático, foi realizada em solução contendo cloreto de potássio (KCl) 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 100 mM, seguida de centrifugação a 1000 g, por 20 minutos, à temperatura de  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e armazenado a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  (BUEGE; AUST, 1987). A segunda parte da amostra de fígado foi imediatamente imersa em fixador de Bouin, onde permaneceu por 2 horas. Após o término desse período, a amostra foi lavada várias vezes em álcool 70% e armazenada em solução alcoólica até sua inclusão em parafina.

De cada rato foi coletado ainda amostra de sangue. Após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos *ependorfs* individuais contendo anticoagulante heparina. O sangue foi imediatamente centrifugado, por 20 minutos, a 1000 g, em centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B- Rotor SM 24). Após esse procedimento, o plasma foi coletado, aliquotado e armazenado à temperatura de  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ .

## 4.7 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

### 4.7.1 Formação de ânion Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

A formação de  $O_2^{\bullet-}$  (SAG) foi estimada pela redução de azul de nitrotetrazol (NBT), conforme técnica descrita por Wang et al. (1998). O método consistiu na reação de cortes de medula espinal com NBT, após incubação de 90 minutos, para formação de formazan, o indicador da formação do  $O_2^{\bullet-}$ . A absorbância do formazan foi determinada

espectrofotometricamente a 540 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A quantidade de formazan reduzido pelo  $O_2^{\bullet-}$  foi calculada com o emprego da fórmula a seguir:

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

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

#### **4.7.2 Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )**

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

#### **4.7.3 Metabólitos do NO**

O método que avaliou os metabólitos do NO (concentrações de nitritos+nitratos) se baseou na reação das amostras com o reagente de Griess, conforme descrito por Granger et al. (1996). Para essa análise, alíquotas de amostras de medula espinal foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase, por 30 minutos, à temperatura ambiente, para conversão de nitrato em nitrito. O nitrito formado foi analisado pela reação desse composto com o reagente de Griess, formando um composto medido em leitora de placas (Zenyth 200, Biochrom Inc, UK) no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram avaliados se comparando os mesmos a uma curva padrão, e foram expressos em mmol/L.

#### 4.7.4 Hidroperóxidos lipídicos

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

As amostras de tecidos foram diluídas, em proporção de 1:10, e separadas em 2 grupos: no primeiro foi acrescentado metanol absoluto (MEOH), e no segundo, trifetilfosfina (TEPP) 10 mmol/L. Ambos os grupos foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, foi pipetado, em microplaca, 10  $\mu\text{l}$  de amostra em quadruplicata (uma duplicata com o metanol, e outra duplicata com o TEPP), adicionando-se em seguida 90  $\mu\text{l}$  do reagente de trabalho (RT-XO). Este consistiu em uma mistura de 81% de MEOH 90%, XO 2 mmol/L para concentração final de 100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mmol/L para concentração final de 25 mmol/L, BHT 40 mmol/L para concentração final de 4 mmol/L e sulfato ferroso amoniacal 10 mmol/L para concentração final de 250  $\mu\text{mol/L}$ .

A placa foi agitada por 30 minutos, em temperatura ambiente e, em seguida, se realizou a leitura em leitora de placas a 570 nm (Zenyth 200, Biochrom Inc, UK). Para os cálculos, foram descontados os valores de absorvância com TEPP dos valores obtidos das duplicatas com MEOH. O resultado foi expresso em  $\mu\text{mol}$  por grama de tecido.

#### 4.7.5 Capacidade antioxidante total

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

#### 4.7.6 Tióis totais

A medida de tióis totais foi conduzida conforme descrito por Aksenov & Markesbery (2001). Para tanto, a amostra foi misturada a tampão PBS/EDTA (pH = 7,5) e a ácido 5,5'-

ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB, 10 mM). Após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 412 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A medida de TNB formado foi calculada conforme a fórmula:

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

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

#### 4.7.7 Ácido ascórbico

O ensaio de quantificação do ácido ascórbico foi realizado conforme técnica descrita por Roe & Kuether (1942), com pequenas adaptações (SCHEID et al., 2014). Inicialmente produziu-se uma curva padrão de ácido ascórbico (AA). As diferentes concentrações de AA foram então misturadas com carvão ativado, de granulometria 1-2 mm, tratado previamente com ácido clorídrico (10%), para conversão do AA em sua forma oxidada, o dehidroascorbato. Após, adicionou-se solução de tiouréia (10%) e solução de 2,3-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (2%), e os tubos *ependorfs* contendo essa mistura de soluções foram colocados em banho-maria a 37 °C, por 3 horas. Terminado este período de tempo, adicionou-se ácido sulfúrico (85%), gota a gota, aos *ependorfs* em banho de gelo, e aguardou-se 30 minutos para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro, a 540 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Na presença de AA desenvolve-se uma coloração alaranjada, proporcional à concentração. As amostras tiveram o mesmo tratamento, porém com a adição de ácido tricloroacético ocorre desproteinização, sendo necessário centrifugar novamente os *ependorfs* por breve período de tempo, e seguir o ensaio utilizando o sobrenadante obtido. A partir da curva padrão, obtiveram-se as concentrações de AA das amostras em micromolar de AA por miligrama de proteína.

#### 4.7.8 Quantificação de proteínas

A quantificação do conteúdo proteico dos tecidos foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Bradford et al. (1976), em comprimento de onda de 625 nm. O conteúdo de proteínas da amostra foi calculado com base nas absorbâncias desta e de um fator de calibração obtido de uma curva-padrão de albumina.

#### 4.7.9 Glutationa-s-transferase (GST)

Para determinação da atividade da enzima GST, empregou-se técnica cujo princípio baseou-se na conjugação da glutatona reduzida (GSH) ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), pela GST presente na amostra em estudo. O composto resultante, dinitrofenilglutationa, pode então ser detectado espectrofotometricamente, a 340 nm, conforme descrito por Habig, Pabst e Jacoby (1974). No ensaio, em uma cubeta de quartzo, adicionaram-se tampão fosfato 0,1 M (pH = 6,5), 30  $\mu$ L de amostra e 200  $\mu$ L de GSH. Zerou-se o espectrofotômetro e rapidamente adicionou-se CDNB 20 mM. A reação foi observada por um minuto, e as absorvâncias nos tempos 0 e 60 s foram anotadas, para posterior cálculo da atividade enzimática, expressa em picomoles por minuto por miligrama de tecido.

#### 4.8 TÉCNICA DE WESTERN BLOT

Após quantificação de proteínas pelo método descrito por Bradford (1976), foi utilizado o sistema *mini-protein* (Bio-Rad®) para a separação das proteínas de interesse por eletroforese em gel SDS-PAGE a 10% (gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). As amostras foram preparadas com tampão de carga (Tris 65 mM, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,1%) na concentração de 80  $\mu$ g de proteína/50  $\mu$ L de amostra. Para a identificação do peso molecular da proteína de interesse, foi utilizado marcador de peso molecular RPN800 (Amersham Pharmacia). Antes de serem submetidas à eletroforese a 120 v por 3 horas, as amostras foram aquecidas a 100 °C, durante 2 minutos, em banho seco (modelo 330-3D, Nova Ética). A eletroforese foi efetuada na presença de tampão de corrida, contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. A separação das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, e pelo marcador de peso molecular. A seguir, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham), e coberto com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol a 20%, pH 8,3). A transferência foi efetuada a 250 mA por aproximadamente 60 minutos.

Para o bloqueio das ligações de proteínas inespecíficas, as membranas foram incubadas com leite em pó semidesnatado a 1% preparado em TTBS (Tris 20 mM, NaCl 140 mM e Tween 20 a 0,05%). A incubação teve duração de 60 minutos e foi realizada à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas a 4 °C por 12 horas, sob agitação constante, com os anticorpos primários para p-p-38(1:500; Merck Millipore,

Billerica, USA), p-Akt e Akt (1:1000 e 1:500, respectivamente; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), SVCT-2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) e GAPDH (1:2000; Merck Millipore, Billerica, USA). Esse último anticorpo serviu como controle de carga. Os anticorpos primários foram dos tipos policlonal (p-p38, p-Akt, Akt e SVCT-2) e monoclonal (GAPDH), todos diluídos em TTBS contendo albumina a 2,5 %. Terminado o período de incubação, as membranas foram lavadas em TTBS (três vezes de 10 minutos cada lavagem) e incubadas com o segundo anticorpo, adequado às características do tipo do anticorpo primário. Esta incubação teve duração de duas horas e ocorreu sob agitação constante, em temperatura ambiente. Antes de proceder à revelação por quimiluminescência, as membranas foram lavadas 3 vezes em TBS (Tris 20 mM e NaCl 140 mM). As bandas imunorreativas foram detectadas mediante uso de substrato luminescente, o ECL (Merck Millipore), seguido de exposição da membrana a filme autorradiográfico (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

#### **4.9 INDICADORES DE FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA**

Para avaliar um possível efeito tóxico do tratamento com vitaminas C, E ou C+E, foi determinado, em plasma, as atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamiltanspeptidase (GGT), bilirrubina direta e total, e creatinina. Como controle, foi feita a determinação dessas atividades no plasma dos animais que receberam administração de veículo. As determinações acima descritas foram realizadas por meio de *kits* comerciais (LABTEST), seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.10 TÉCNICA DE HEMATOXILINA E EOSINA**

Para avaliar a morfologia dos hepatócitos, foi empregada a técnica de hematoxilina e eosina. Inicialmente realizou-se a desidratação das amostras em soluções alcoólicas de concentrações crescentes: álcool 96° (duas trocas a cada uma hora) e álcool 100° (três trocas a cada uma hora). Ao término deste procedimento, as amostras foram submetidas a 3 banhos em parafina, cada um com duração de uma hora. Em seguida, cada amostra foi montada em bloco de parafina. Após o endurecimento da parafina, o bloco de parafina contendo a amostra de tecido foi seccionado em micrótomo (Leitz). Os cortes de 10 µm de espessura foram

montados em lâminas albuminizadas. Após secagem em estufa a 37 °C (ROMEIS, 1928), as lâminas contendo os cortes de fígado foram hidratadas e, em seguida, colocadas em solução de hematoxilina de Mayer (0,5 g de Hematoxilina, 100 mg de Iodato de Sódio, 25 g de alúmen de Potássio, 0,5 g de ácido cítrico, 25 g de hidrato de cloral dissolvidos em 500 mL de água destilada) por 8 minutos, em temperatura ambiente. Ao término deste período, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 20 minutos e, em seguida, colocadas, por 15 a 30 segundos, em solução de eosina 0,5% (500 mg de eosina dissolvida em 100 mL de água destilada). A seguir, as lâminas passaram rapidamente por álcool 95% e 100%, seguida de duas passagens em xilol, tendo cada uma delas duração de 1 minuto. Ao término destas etapas, as lâminas foram montadas com Entellan e lamínulas. Os cortes corados foram examinados e fotografados através do fotomicroscópio NIKON OPTIPHOT-2 equipado com câmera fotográfica NIKON FX-35DX.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Previamente a realização do estudo se fez o cálculo do “n” (número mínimo de animais) utilizando o software WIN PEPI, versão 9.1 . Este cálculo foi baseado na análise da atividade enzimática da GST em animais tratados com vitaminas C e E, utilizando-se os dados mostrados por KASHIF et al. (2004), e em resultados de parâmetros nociceptivos (LU et al., 2011). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 95%, assumindo uma perda de 10% para esse estudo.

Para a análise estatística dos dados, inicialmente foi avaliado se os valores eram paramétricos. Sendo paramétricos, os resultados dos testes de von Frey e da placa quente foram analisados pelo emprego de ANOVA de medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey. Para a análise dos resultados do IFI, dos parâmetros oxidativos e nitrosativos e de proteínas de sinalização, a comparação dos resultados se deu mediante emprego do teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias (1- lesão; 2 - tratamento). Havendo diferença estatisticamente significativa, foi utilizado o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou  $P < 0,05$  (software Statistica Stat soft ). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

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

##### **Resíduos químicos**

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

##### **Resíduos biológicos**

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

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ARTIGO 1

Este artigo mostra os efeitos temporais da administração de vitaminas C e E, isoladas ou juntas, sobre parâmetros nociceptivos em ratos com CCI. Nesse artigo é apresentado ainda o efeito do tratamento administrado por vias oral e intraperitoneal, e do uso combinado de vitaminas C+E concomitante a gabapentina. O artigo apresenta ainda a duração do efeito antinociceptivo das vitaminas após o término do período de 3 e 10 dias de administrações diárias; o resultado das análises dos indicadores de função hepática e renal; e parâmetros oxidativos avaliados em nervo isquiático lesionado e fígado. Este artigo foi publicado na revista *Brain Research Bulletin* em fevereiro de 2016.

Citação do artigo: RIFFEL, A. P. K. *et al.* Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Brain Research Bulletin*, 2016. v. 121, p. 169–177.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.02.004>>.



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research Bulletin

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/brainresbull](http://www.elsevier.com/locate/brainresbull)

Research report

## Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats



Ana Paula K. Riffel\*, Jéssica A. de Souza, Maria do Carmo Q. Santos, Andréa Horst, Taína Scheid, Carolina Kolberg, Adriane Belló-Klein, Wania A. Partata

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 December 2015  
Received in revised form 18 January 2016  
Accepted 3 February 2016  
Available online 6 February 2016

#### Keywords:

Mechanical threshold  
Thermal threshold  
Sciatic functional index  
Antioxidant  
Lipid peroxidation  
Oxidative stress

### ABSTRACT

Antioxidants have been tested to treat neuropathic pain, and  $\alpha$ -Tocopherol (vitamin E—vit. E) and ascorbic acid (vitamin C—vit. C) are potent antioxidants. We assessed the effect of intraperitoneal administration of vit. C (30 mg/kg/day) and vit. E (15 mg/kg/day), given alone or in combination, on the mechanical and thermal thresholds and the sciatic functional index (SFI) in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve. We also determined the lipid hydroperoxides and total antioxidant capacity (TAC) in the injured sciatic nerve. Further, we assessed the effects of oral administration of vit. C + vit. E (vit. C + E) and of a combination of vit. C + E and gabapentin (100 mg/kg/day, i.p.) on the mechanical and thermal thresholds of CCI rats. The vitamins, whether administered orally or i.p., attenuated the reductions in the mechanical and thermal thresholds induced by CCI. The antinociceptive effect was greater with a combination of vit. C + E than with each vitamin given alone. The SFI was also improved in vitamin-treated CCI rats. Co-administration of vit. C + E and gabapentin induced a greater antinociceptive effect than gabapentin alone. No significant change occurred in TAC and lipid hydroperoxide levels, but TAC increased (45%) while lipid hydroperoxides decreased (38%) in the sciatic nerve from vit. C + E-treated CCI rats. Thus, treatment with a combination of vit. C + E was more effective to treat CCI-induced neuropathic pain than vitamins alone, and the antinociceptive effect was greater with co-administration of vit. C + E and gabapentin than with gabapentin alone.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

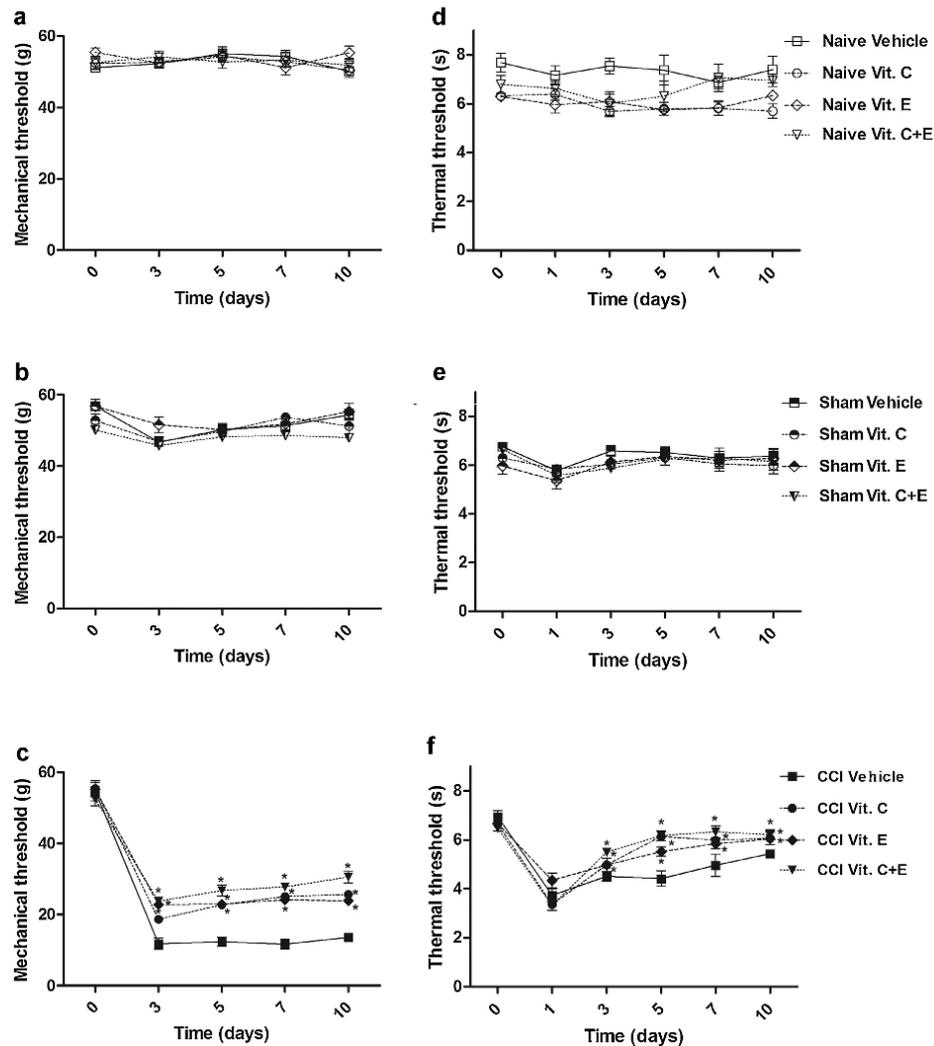
### 1. Introduction

The role of reactive oxygen species (ROS) has been emphasized in the generation of neuropathic pain (Treede et al., 2008; Guedes et al., 2006), pain arising as a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system (Treede et al., 2008). Based on these findings, some dietary antioxidants have been tested for their clinical efficacy in treating neuropathic pain because they tend to be safe and well tolerated (Areti et al., 2014).  $\alpha$ -Tocopherol (vitamin E—vit. E) and ascorbic acid (vitamin C—vit. C) are potent antioxidants with high biological activity (Warzyniak et al., 2013) and widely accepted by the general public (Traber and Stevens, 2011). Vit. E is a potent lipophilic chain-breaking antioxidant, found in inflammatory mediators (Bruno et al., 2006), and also acts on signalling molecules involved in nociception (Naziroglu and Özgül,

2013; Hedge et al., 2012).  $\alpha$ -Tocopherol is its most active isomer, and is rapidly depleted in the body, requiring regeneration through other antioxidants present in the water-soluble portion of the cell, such as ascorbate (Halliwell, 2006). The latter is the monovalent anion of vit. C (L-ascorbic acid), an effective water-soluble antioxidant (Rice, 2000) and an essential cofactor in numerous enzymatic reactions (Takanaga et al., 2004). There is evidence that vit. C has an antinociceptive effect (Okubo et al., 2012; Schencking et al., 2010).

A previous study showed that the systemic administration of a combination of vit. C + vit. E inhibited the early behavioral responses to formalin injection and neuropathic pain behavior after peripheral-nerve injury (Lu et al., 2011). This study used spared nerve injury as a neuropathic pain model. One of the most commonly employed animal models of neuropathic pain is the chronic constriction injury (CCI), which simulates the symptoms of chronic nerve compression that correspond to causalgia or complex regional pain syndrome in patients (Jaggi et al., 2011; Klusáková and Dubový, 2009). According to Jaggi et al. (2011), each animal model has been created with specific methodology, and the results tend to vary widely with slight changes in methodology to induce

\* Corresponding author at: Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.  
E-mail address: [anapr@gmail.com](mailto:anapr@gmail.com) (A.P.K. Riffel).



**Fig. 1.** Assessment of mechanical (a, b, c) and thermal (d, e, f) thresholds in rats with CCI of the sciatic nerve, which received vehicle, vit. C (30 mg/kg/day), vit. E (15 mg/kg/day) or a combination of these vitamins (vit. C + E), intraperitoneally (i.p.), for 10 days. Data represent mean  $\pm$  SEM. \* Indicates significant difference compared to pre-nerve lesion values (repeated-measures ANOVA followed by Tukey post-hoc test,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ). Naive vehicle, saline-treated naive rats; Naive vit. C, vit. C-treated naive rats; Naive vit. E, vit. E-treated naive rats; Naive vit. C + E, vit. C + E-treated naive rats; Sham vehicle, saline-treated sham rats; Sham vit. C, vit. C-treated sham rats; Sham vit. E, vit. E-treated sham rats; Sham vit. C + E, vit. C + E-treated sham rats; CCI vehicle, saline-treated CCI rats; CCI vit. C, vit. C-treated CCI rats; CCI vit. E, vit. E-treated CCI rats; CCI vit. C + E, vit. C + E-treated CCI rats. The days after surgery are represented on the x-axis.

pain; therefore, it is essential that data from different pain models be reported and interpreted in the context of the specific pain model. Thus, our study assessed the effect of intraperitoneal (i.p.) administration of vit. C (30 mg/kg/day), vit. E (15 mg/kg/day) and vit. C + vit. E (vit. C + E), in the same doses, given for 3 and 10 days, on the mechanical and thermal thresholds of rats submitted to CCI of the sciatic nerve. In addition, we analyzed the sciatic functional index (SFI), as a proof of functional recovery post-nerve lesion, as well as the lipid hydroperoxides and the total antioxidant capacity (TAC) in the injured sciatic nerve.

We also assessed the effects of oral administration of vit. C + E and co-administration of vit. C + E with gabapentin (100 mg/kg/day, i.p.) on the mechanical and thermal thresholds, using the same treatment time periods described above. Co-administration was used because the co-administration of ascorbic acid and other analgesic drugs (morphine and tramadol) provide a better antinociceptive effect than individual drugs (Zeraati et al., 2014). Gabapentin was used because it is often used as an analgesic to control neuropathic pain (Hamidi et al., 2014; Magrinelli et al., 2013). Our study also evaluated the effect of the administration

of the vitamins alone or in combination on blood parameters, including gamma-glutamyltransferase (gamma-GT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), bilirubin, and creatinine. We also measured the activity of glutathione-S-transferase (GST), enzyme that plays a major part in the detoxification of xenobiotics (Maher, 2006), lipid hydroperoxides and TAC in the liver; as well as the hepatocyte morphology. The plasma and hepatic parameters was assessed in naive rats to reveal possible side effects of the treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental animals

All animal procedures were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (#23352). Adult male Wistar rats, weighing 200–250 g, were divided into three experimental groups (Naive, Sham and CCI), and each was further divided into four subgroups (n = 12/subgroup), which received vit. C (30 mg/kg/day – L-Ascorbic Acid, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), vit. E (15 mg/kg/day – DL-alpha-tocopherol acetate, Sigma Chemical Co.), a combination of these vitamins in the same doses (vit. C+vit.E) or vehicle for 3 and 10 days (n = 6/each treatment). The vitamins were freshly prepared in saline or drinking water containing 1% Tween 80. Saline or drinking water containing 1% Tween 80 were used as vehicles. The administration started on the day of surgery (after recovery from anesthesia) and was performed daily at 17:00 h by the same experimenter.

The experiments are described separately below, in the sequence in which they were performed.

Experiment 1: Naive, sham and CCI rats received vehicle, vit. C, vit. E or vit. C+E, i.p., for 3 and 10 days. The mechanical and thermal thresholds were assessed before the surgical procedure (Day 0) and 3, 5, 7 and 10 days after the injury. The SFI and biochemical parameters were assessed in all groups at days 3 and 10. Plasma and hepatic parameters were assessed in the naive group at day 10.

Experiment 2: CCI rats received vehicle, vit. C, vit. E or vit. C+E, i.p., for 3 and 10 days. After treatment for 3 days, the administration was stopped and the mechanical and thermal thresholds were assessed each day until the levels returned to those found in vehicle-treated CCI rats. We then restarted the administrations of vitamins, which were maintained for 10 days. After this period, the administration stopped and the mechanical and thermal thresholds were assessed daily until they returned to those found in vehicle-treated CCI rats.

Experiment 3: CCI rats received, diluted in drinking water, vit.C+E for 10 days. The mechanical and thermal thresholds were assessed before the surgical procedure (Day 0) and 3 and 10 days after the injury.

Experiment 4: CCI rats were divided into two experimental groups, which received gabapentin (100 mg/kg/day, i.p.) or gabapentin (i.p.)+vit.C+E (oral) for 10 days. The mechanical and thermal thresholds were assessed as in experiment 3.

### 2.2. Induction of peripheral neuropathy by CCI

CCI was performed based on the procedure described by Bennett and Xie (1988). After anesthesia (90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine), the right common sciatic nerve was exposed via a mid-thigh incision. Proximal to the sciatic trifurcation, the nerve was freed of adhering tissue for about 7 mm, and four ligatures (4.0 Shalon Chromic Catgut) were tied loosely around it, with a 1.0–1.5 mm interval between each ligature. After nerve ligation, the muscle and skin layer was immediately sutured with thread

and a topical antibiotic applied. To expose the sciatic nerve in Sham rats, all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature.

### 2.3. Behavioral assessment

Mechanical threshold was assessed by electronic von Frey apparatus (Insight, Brazil). A positive response was indicated by an abrupt withdrawal of the paw, and the intensity of the pressure was automatically recorded (in grams). A single trial consisted of five applications of the plastic tip, once every 5–10 s. The mean of five readings was taken as the threshold for a particular timing trial. Thermal threshold was measured by placing the rats on a hot plate maintained at 50 °C. Withdrawal latency was considered when the animal jumped or licked a hind paw, independently of the side. A cutoff time of 30 s was employed to prevent tissue injury. Behavioral assessments were conducted at the same time of day (08:00 h) and by the same experimenter.

### 2.4. Sciatic functional index (SFI)

Recovery of right hindlimb locomotor activity was monitored by analysis of the free walking pattern according to De Medinaceli et al. (1982). The rats' footprints were used to determine the following measurements: (1) distance from the heel to the third toe, the print length (PL); (2) distance from the first to the fifth toe, the toe spread (TS); and (3) distance from the second to the fourth toe, the intermediate toe spread (ITS). The 3 measurements were obtained from the experimental (E) and normal (N) sides. Several prints of each foot were obtained on each track, but only 3 prints of each foot were used to determine the mean measurements on the experimental and normal sides. These means were included in the sciatic functional index (SFI) formula.

$$\text{SFI} = -38.3(\text{EPL} - \text{NPL})/\text{NPL} + 109.5(\text{ETS} - \text{NTS})/\text{NTS} + 13.3(\text{EIT} - \text{NIT})/\text{NIT} - 8.8$$

The result was considered an index of the functional conditions of the sciatic nerve, where zero ( $\pm 11$ ) represents the normal function and about –100 represents the loss that results from CCI. The tests were conducted at the same time of the day (07:00 h) by the same experimenter.

### 2.5. Tissue sample preparation

At the end of experiment 1, rats were killed by decapitation, and blood, liver and a segment ( $\pm 7$  mm) of the sciatic nerve located above the injury site were promptly collected. The blood was centrifuged for 15 min at 1000g and the plasma used to determine gamma-GT, AST, ALT, total and direct bilirubin and creatinine. Commercially available kits (LABTEST) were used for these assays.

Sciatic nerves and a portion of liver were homogenized in 1.15% KCl diluted 1:5 (w/v) and containing 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride. Homogenates were centrifuged at 1000 x g for 20 min at 4 °C. The supernatant fraction obtained was frozen at –60 °C and used for the assays of oxidative parameters. Another portion of the liver was immersed in Bouin solution, embedded in paraffin, and cut into 10  $\mu$ m sections, which were stained using the hematoxylin and eosin method.

### 2.6. Determination of the biochemical parameters

The lipid hydroperoxides were measured by oxidation of Fe<sup>2+</sup> by LOOH in an acid medium containing xylenol orange dye, which

forms a complex with  $\text{Fe}^{3+}$ , as described by Jiang et al. (1991). Results are expressed in  $\text{nmol g tissue}^{-1}$ .

The total antioxidant capacity (TAC) was determined with 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid radical cation ( $\text{ABTS}^{*+}$ ), which in an acid medium is decolorized by antioxidants, according to their concentration and antioxidant capacity (Erel, 2004). Results are expressed in  $\text{mmol eq trolox g tissue}^{-1}$ .

GST activity, expressed as  $\text{pmol min mg tissue}^{-1}$ , was measured by the rate of formation of dinitrophenyl-S-glutathione at 340 nm (Habis et al., 1974).

### 2.7. Statistical analysis

Biochemical results and SFI were analyzed by three-way ANOVA (factors: lesion, treatment and time). Behavioral parameters were compared by two-way ANOVA (factors: treatment and time) (experiment 2) and two-way repeated-measures ANOVA (other experiments). The post-hoc Tukey test was used in all comparisons. Differences were considered statistically significant when  $p$  was  $<0.05$ . All statistical analyses were carried out with the software Statistica 7.0.

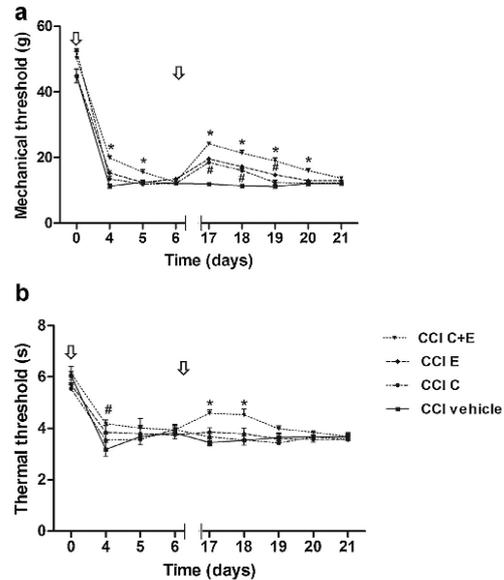
## 3. Results

### 3.1. Behavioral assessment

The mechanical (Fig. 1a and b) and thermal thresholds (Fig. 1d and e) did not change significantly in the naive and sham groups. After CCI, rats exhibited increases in the mechanical (Fig. 1c) and thermal (Fig. 1f) sensitivities at day 3. The mechanical threshold of the vehicle-treated CCI rats decreased 78.5% compared to pre-nerve lesion levels. The same response was found at days 5, 7 and 10. At 3 days after CCI, the reduction was 54.7% in the mechanical threshold of the vit. C + E-treated rats, compared to pre-nerve lesion levels. The reduction was 65% and 62% in CCI rats that received vit. C or vit. E, respectively. Comparing vehicle and vitamin-treated CCI rats, vit. C + E-treated rats showed an improvement of 102% in the mechanical threshold at day 3, whereas the percentages were 124% and 137% at days 7 and 10, respectively. At day 3, the percentages were 58% and 93% with vit. C or E, and day 10 were 97% and 83%, respectively. The changes in the thermal threshold were similar to those in the mechanical threshold (Fig. 1f).

After 3 days of i.p. vit. C + E administration, the antinociceptive effect persisted for 2 days (Fig. 2a). When vit. C + E was administered for 10 days and then stopped, the antinociceptive effect persisted for 4 days. After administration of vit. C or vit. E for 3 days, no antinociceptive effect persisted after the end of the treatment. When these vitamins were administered for 10 days and then stopped, the antinociceptive effect persisted for 2 days in the CCI rats that received vit. C, but 3 days in those treated with vit. E.

Thermal threshold was increased after the end of the vitamin administration only in vit. C + E-treated-CCI rats. After treatment for 3 days, an antinociceptive effect was apparent 1 day after the end of the administration. When CCI rats received vit. C + E for 10 days, the antinociceptive effect persisted for 2 days (Fig. 2b).



**Fig. 2.** Assessment of mechanical (a) and thermal (b) thresholds in CCI rats which received vehicle, vit. C (30 mg/kg/day), vit. E (15 mg/kg/day) or a combination of these vitamins (vit. C + E), intraperitoneally (i.p.), for 3 and 10 days. After treatment for 3 days, the administration stopped and the mechanical and thermal thresholds were assessed daily (days 4, 5 and 6) until the values returned to those found in vehicle-treated CCI rats (day 6). At day 7, the administration of vitamins was resumed and continued for 10 days (7–16). When the administration stopped, the mechanical and thermal thresholds were assessed daily (days 17–21) until they returned to those found in vehicle-treated CCI rats (day 21). The arrows correspond to the beginning of the administrations. The break in x axis corresponds to days of the second treatment period (7–16). Data represent mean  $\pm$  SEM. \*Indicates significant difference compared to the other groups at the same time point. #Indicates significant difference compared to the groups that received only the vehicle at the same time point (two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ). Day 0 in x axis corresponds the media before the surgery.

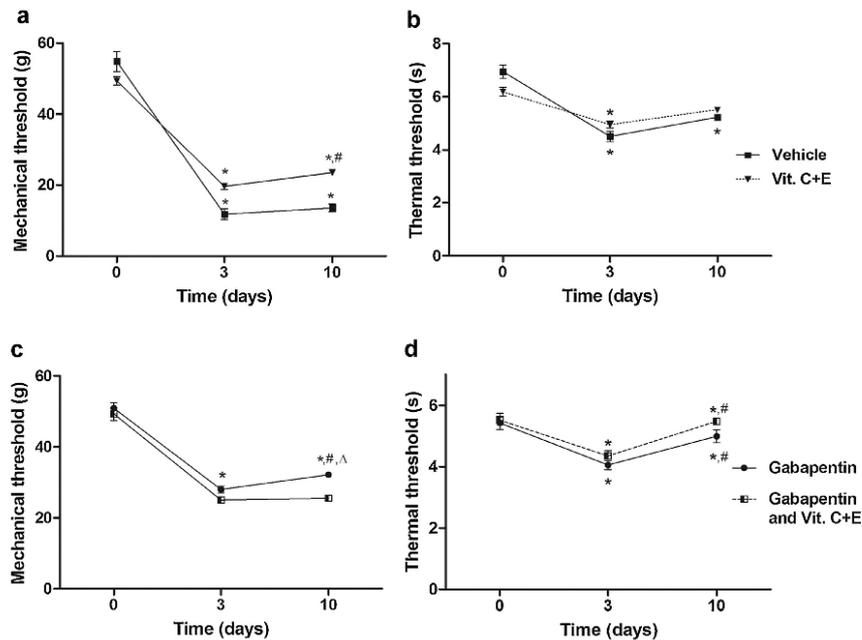
The oral administration of vit. C + E also induced antinociception in CCI rats. There was a reduction of around 60% in the mechanical threshold after 3 days of treatment, while the reduction was 52% at day 10, when compared to the pre-nerve lesion level (Fig. 3a). For the thermal threshold (Fig. 3b), the reduction was 20% at day 3, compared to baseline values, but was similar to the pre-nerve lesion level at day 10.

Similarly to another study (Hamidi et al., 2014), administration of gabapentin induced antinociception in CCI rats. This effect was found at days 3 and 10 (Fig. 3c and d). The decline in the mechanical threshold of the gabapentin-treated CCI rats was 49% at days 3 and 10 compared to the baseline. The decline in this threshold was

**Table 1**  
Effect of vitamin C (vit. C), vitamin E (vit. E) and vit. C + E administrations on plasmatic parameters in naive rats.

	Vehicle	Vit. C	Vit. E	Vit. C + E
AST (U/L)	213.86 $\pm$ 6.47	252.20 $\pm$ 15.69	242.80 $\pm$ 13.64	210.13 $\pm$ 10.55
ALT (U/L)	30.30 $\pm$ 4.47	40 $\pm$ 4.93	39.52 $\pm$ 3.10	29.60 $\pm$ 5.13
Gamma Gt (U/L)	19.28 $\pm$ 7.50	29.31 $\pm$ 8.53	28.23 $\pm$ 9.42	21.83 $\pm$ 4.07
Total bilirubin (mg/dL)	0.16 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02
Direct bilirubin (mg/dL)	0.10 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01
Creatinine (mg/dL)	0.98 $\pm$ 0.06	0.99 $\pm$ 0.09	1 $\pm$ 0.04	1.09 $\pm$ 0.01

Data represent mean  $\pm$  S.E.  $n=6$  rats/group. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; Gamma Gt, gamma-glutamyltranspeptidase.



**Fig. 3.** Assessment of mechanical (a,c) and thermal (b,d) threshold in CCI rats which received, diluted in drinking water, a combination of vit. C + E (30 mg/kg/day and 15 mg/kg/day, respectively) (a and b) or co-administration of vit. C + E (30 mg/kg/day and 15 mg/kg/day, respectively, orally) and gabapentin (100 mg/kg/day, intraperitoneally) (c and d) for 10 days. Data represent mean  $\pm$  SEM. \* Indicates significant difference compared to pre-nerve lesion values. # Indicates significant difference in the same group after 3 days.  $\Delta$  Indicates significant difference between groups at the same time point (repeated-measures ANOVA followed by Tukey post-hoc test,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ).

only around 45% and 37% in gabapentin + vit. C + E-treated CCI rats at days 3 and 10, respectively, compared to the baseline. For the thermal threshold, the decrease was 26% at day 3 and 7% at day 10 compared to the baseline. The administration of gabapentin + vit. C + E induced a decrease in this threshold of around 22% at day 3. At day 10, the value found was similar to that for the baseline. Thus, the co-administration of vit. C + E and gabapentin induced around 12% and 26% improvement in the mechanical and thermal thresholds at days 3 and 10, respectively, compared to gabapentin alone (Fig. 3c and d). The percent was 30% and 16% in the mechanical threshold at days 3 and 10, respectively, when compared to oral administration of vit. C + E alone.

### 3.2. Effects on SFI

The SFI did not show significant changes in naive (Fig. 4a) and sham (Fig. 4b) rats. CCI, in turn, decreased SFI. No sign of functional recovery was observed in vehicle-treated CCI rats at days 3 and 10 (Fig. 4c). Vitamin administration induced a significant improvement in the SFI at day 10, which was 16%, 23% and 24% in vit. C, vit. E and vit. C + E-treated CCI rats, respectively, compared to vehicle-

treated CCI rats. Gabapentin induced improvement of 13% in the SFI, whereas the percentage was around 33% in gabapentin + vit. C + E-treated CCI rats, compared to vehicle-treated CCI rats. The SFI was  $-67.69 \pm 3.40$  in gabapentin-treated CCI rats, while this index was  $-51.70 \pm 4.26$  in gabapentin + vit. C + E-treated CCI rats (data not shown).

### 3.3. Effects on biochemical parameters

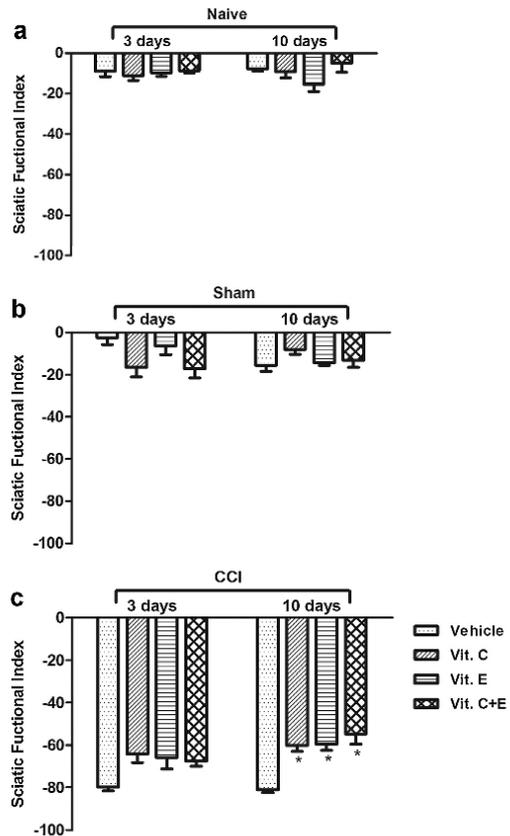
The TAC (Fig. 5a) and lipid hydroperoxides (Fig. 5b) showed no significant changes in the injured sciatic nerve. However, the TAC increased by around 30% in the nerve from CCI rats that received vit. C ( $2.93 \pm 0.18$  mmol eq trolox g tissue $^{-1}$ ) or vit. E ( $2.93 \pm 0.21$  mmol eq trolox g tissue $^{-1}$ ) for 10 days, while the increase was around 45% ( $3.26 \pm 0.08$  mmol eq trolox g tissue $^{-1}$ ) in vit. C + E-treated CCI rats, compared to vehicle-treated CCI rats ( $2.25 \pm 0.14$  mmol eq trolox g tissue $^{-1}$ ). The lipid hydroperoxides decreased by around 22% ( $1.49 \pm 0.08$  nmol g tissue $^{-1}$ ), 8% ( $1.75 \pm 0.23$  nmol g tissue $^{-1}$ ) or 38% ( $1.18 \pm 0.07$  nmol g tissue $^{-1}$ ) in the nerve from CCI rats that received vit. C, vit. E or vit. C + E, respectively, for 10 days, compared to vehicle-treated CCI rats ( $1.90 \pm 0.12$  nmol g tissue $^{-1}$ ).

**Table 2**

Effect of vitamin C (vit. C), vitamin E (vit. E) and vit. C + E administrations on oxidative parameters in liver of naive rats.

	Vehicle	Vit. C	Vit. E	Vit. C + E
TAC (uM eq. Trolox g tissue $^{-1}$ )	$0.43 \pm 0.05$	$0.51 \pm 0.02$	$0.61 \pm 0.01$	$0.64 \pm 0.02$
Lipid Hydroperoxides (nmol g tissue $^{-1}$ )	$2.36 \pm 0.5$	$1.57 \pm 0.24$	$1.94 \pm 0.62$	$1.78 \pm 0.50$
GST (pmol/min/mg tissue)	$1.77 \pm 0.15$	$1.44 \pm 0.09$	$1.49 \pm 0.14$	$1.53 \pm 0.06$

Data represent mean  $\pm$  S.E.  $n = 6$  rats/group. TAC, total antioxidant capacity; GST, glutathione-S-transferase.



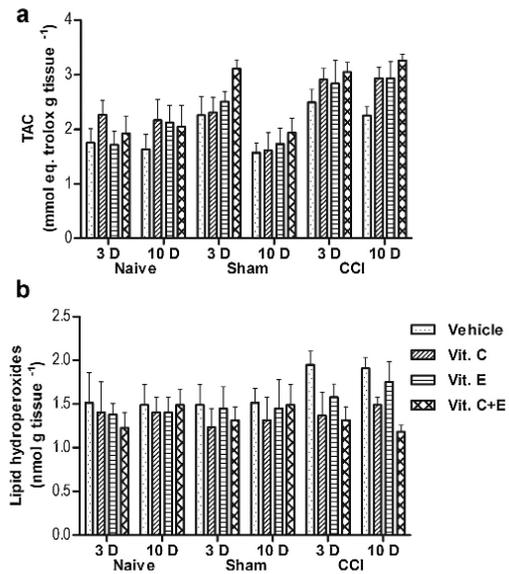
**Fig. 4.** Functional recovery assessed by the Sciatic Functional Index (SFI) in CCI rats, which received vehicle (saline), vit. C (30 mg/kg/day), vit. E (15 mg/kg/day) or a combination of these vitamins (vit. C+E), intraperitoneally (i.p.), for 3 and 10 days. On the Y axis, the results are expressed in units, and 0 indicates normality and -100 the total absence of functionality. Data represent mean  $\pm$  SEM. \*Indicates significant difference compared to saline-treated CCI group (Three-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ).

### 3.4. Effects on plasma and histopathological parameters

Plasma AST, ALT, Gamma Gt, total bilirubin, direct bilirubin and creatinine levels did not show significant changes with vitamin administrations (Table 1). Similarly, the vitamins did not induce significant changes in TAC, lipid hydroperoxides and GST activity in liver from naive rats (Table 2). The morphology of the hepatocytes did not change with the vitamin treatment (Fig. 6).

## 4. Discussion

We used rats as the experimental model because these animals are the most frequently used laboratory animals for experimental models of peripheral neuropathic pain (Jaggi et al., 2011; Klusáková and Dubový, 2009). Rats can synthesize their own ascorbic acid (Rice, 2000). With oral (gavage) dosing (0.5 mg per gram of body weight), initial plasma ascorbate concentrations of  $50 \mu\text{M}$  did not increase to  $>100 \mu\text{M}$ . This was similar to findings for tight control of ascorbate concentrations in humans. Intraperitoneal injection



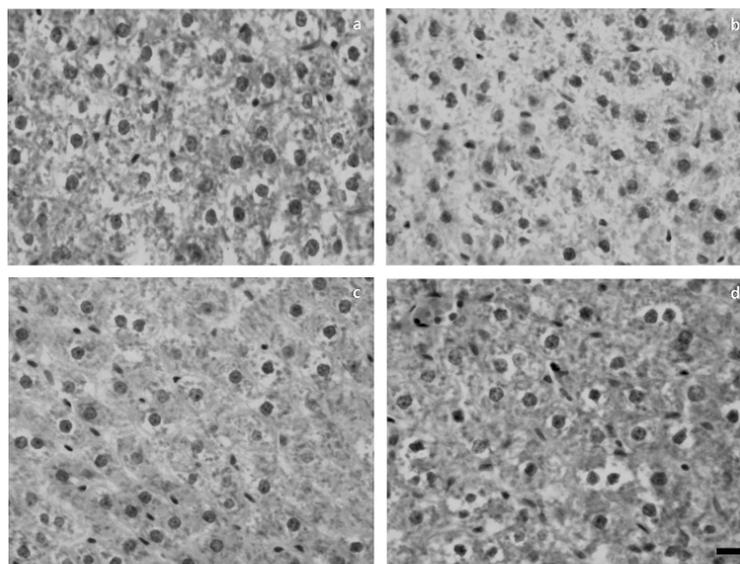
**Fig. 5.** Effects of vit. C (30 mg/kg/day), vit. E (15 mg/kg/day) or a combination of these vitamins (vit. C+E) administered intraperitoneally for 3 and 10 days on (a) total antioxidant status (TAC) and (b) lipid hydroperoxides in the injured sciatic nerve of CCI rats. Data represent mean  $\pm$  SEM.

of the same ascorbic-acid dose produced peak concentrations of  $\approx 3 \text{ mM}$ , 30-fold higher than concentrations produced by oral dosing (Chen et al., 2007). Therefore, we reduced the ascorbic-acid dose by 40%, which reduced the peak concentration of ascorbic acid.

The antinociceptive effect of the intraperitoneal and oral administration of vit. C+E is in line with a previous study that used mice submitted to spared nerve injury (Lu et al., 2011). These results suggest that these vitamins given in combination have an antinociceptive effect in different neuropathic pain models. However, whereas Lu et al. (2011) found no antinociceptive effect with vit. C or vit. E administration, an antinociceptive effect was observed in the present study, and by other authors using different neuropathic pain models such as alcohol-induced peripheral neuropathy (Tiwari et al., 2012), sciatic nerve crush injury (Morani and Bodhankar, 2010) and streptozotocin-diabetic peripheral neuropathy (van Dam et al., 1999). Although further studies are needed to explain the difference, the different pain models used should be considered. Each animal model has been created with a specific methodology, and the results tend to vary widely with slight changes in methodology (Jaggi et al., 2011).

Interestingly, the differences in the experimental protocol appear not to have affected the results when vitamins were given in combination. A possible explanation may be the greater antinociceptive effect of the vitamins when in combination than alone. As suggested by Lu et al. (2011), this may be due to a synergistic effect of the vitamins in combination. Vit. C functions to regenerate vit. E from its radical form (Park et al., 2013). The vit. C+E administrations may have enabled the storage of vit. E in adipose tissue and a cumulative effect of this vitamin. This may have induced the maintenance of a long-term antinociceptive effect after the vit. C+E administration ended.

While no antinociceptive effect was found at the end of the treatment when vit. C or vit. E were used for a short time, this effect persisted for some days after the longer treatment. The effect



**Fig. 6.** Cross sections of the liver from naive rats that received vehicle (saline) (a), vit. C (30 mg/kg/day) (b), vit. E (15 mg/kg/day) (c) or a combination of these vitamins (vit. C+E) (d), intraperitoneally, for 10 days. Note the morphological similarity of hepatocytes stained with hematoxylin and eosin. Calibration bar: 30  $\mu$ m (a–d).

was more lasting for vit. E than vit. C. Since vit. E is fat-soluble and plays a critical role in protection against lipid peroxidation (Park et al., 2013), storage of this vitamin in adipose tissue may have contributed to its more-lasting antinociceptive effect. ROS are increased in neuropathic pain conditions (Areti et al., 2014; Treede et al., 2008; Guedes et al., 2006), and antioxidant agents appear to play a role in the attenuation of this pain (Takanaga et al., 2004). Because vit. C is water-soluble and easily excreted in the urine (Chen et al., 2007), the tight control of this vitamin likely contributed to the short duration of the antinociceptive effect after the end of the treatment. However, it has been suggested that several potential functions of vit. C, including antioxidation and neuro-modulation, may play an important role in pain relief (Kiabi et al., 2013). It is likely that the administration of vit. C for a longer period induced a higher activation of these functions, which may have contributed to maintain the antinociceptive effect after the end of the treatment.

Accumulating evidence indicates that the reduction of ROS by administration of scavengers or antioxidant compounds attenuates the nociceptive behavior in various animal models of neuropathic pain (Park et al., 2013; Kiabi et al., 2013; Kim et al., 2012). Although administration of vit. C, vit. E or vit. C+E did not induce significant changes in lipid peroxidation and TAC in the sciatic nerve from CCI rats, the percentage of changes in these parameters after vitamin administrations does not permit us to exclude the possibility of this relationship. However, other effects of the vitamins need to be considered. Studies have suggested that vit. C and vit. E produce antinociception by their effects on the central nervous system (Park et al., 2013; Kim et al., 2012). Although our study was designed to demonstrate the behavioral effects of vit. C, E and C+E administration, we cannot exclude the role of the central actions of these vitamins on antinociception. Other functions of the vitamins such as decrease in biomarkers of inflammation (Oliveira et al., 2012; Libinaki et al., 2010), inhibition of the macrophage migration inhibitory factor (Hedge et al., 2012) and  $C_{av}3.2$  isoform of T-type

calcium channels (Nelson et al., 2007) may also have contributed to the antinociception.

Our neuropathic pain model reproduced classical symptoms of allodynia and impairment of motor function (Santos et al., 2014). However, the animals that received vitamins showed some recovery in this parameter. Since it was suggested that the CCI-induced foot deformities are most likely attributable to spontaneous ongoing pain rather than to mechanical allodynia (Nakazato-Imasato and Kurebayashi, 2009), the recovery in SFI may be related to attenuation of the spontaneous ongoing pain.

Recently, it was demonstrated in mice that co-administration of ascorbic acid and morphine or tramadol induced a better antinociceptive effect than the individual drugs (Zeraati et al., 2014). The intrathecal injection of combined gabapentin and vit. E significantly reduced nociceptive behaviors in rats (Kim et al., 2012). To our knowledge, this is the first demonstration that co-administration of gabapentin and vit. C+E induces higher attenuation in neuropathic pain by CCI than gabapentin alone. Since CCI model has helped to open new avenues of research into the mechanisms of all forms of neuropathic pain and the search for effective treatments (Jaggi et al., 2011), the demonstration of a higher degree of antinociception with co-administration of vit. C+E together with gabapentin suggests that this combination could be beneficial in the treatment of neuropathic pain. Despite the exact mechanism by which gabapentin alleviates pain is poorly understood, it has been suggested two pathways:  $\alpha$ - $2\delta$   $Ca^{2+}$  channels and interleukin-10-Heme Oxygenase-1 signalling pathway (Stoicescu et al., 2015; Kukkar et al., 2013). Gabapentin also decrease excitatory amino acid transporter 3 (Gil et al., 2015). A cooperation of these mechanisms with those of the vitamins could explain the better antinociceptive effect with the co-administration of gabapentin and vit. C+E. Our finding that the antinociceptive effect persisted after the end of the treatment with vit. C+E suggests that daily treatment with both vitamins may not be necessary after the initial treatment. This could

reduce the possibility of further side effects with daily treatment with both vitamins for long periods.

However, our study used an animal model, and the results need to be confirmed in human subjects because of possible differences in responses. One difference is the metabolic rate between rats and humans. But 15 mg of vit. E per rat would correspond to 3 g for a 60-kg human, a dose that is within the range used clinically in humans (2000–5000 IU of vit. E or about 2–5 g) (Park et al., 2013). According to these authors, the amount of vit. C that can be used safely in adult humans is twofold higher than that of vit. E. The lack of significant changes in the plasma and hepatic indicators and hepatocyte morphology appears to indicate that the vitamins had no toxic effect on naive rats, which raises the possibility of clinical use of vit. C + E as an adjuvant to treat neuropathic pain. However, it is necessary to analyze the effect of the vitamins, principally vit. C, on tissues. This vitamin is a prooxidant agent in tissue, but not in blood (Chen et al., 2007).

In conclusion, our results support the antinociceptive effect of vit. C, vit. E and vit. C + E, and showed, for the first time, that the intraperitoneal and oral administration of vit. C + E induces greater antinociception than vit. C or vit. E given alone in rats with CCI-induced neuropathic pain. The antinociceptive effect is maintained for some days after the end of the treatment with vitamins. Again, the effect persisted longer in CCI rats that received vit. C + E than in those treated with vit. C or vit. E. Co-administration of vit. C + E and gabapentin produced a greater antinociceptive effect than the drug given alone. Thus, the treatment with a combination of vit. C + E appears to be more effective to treat CCI-induced neuropathic pain than the vitamins individually. Since the identification of new molecules with potential activity to attenuate pain could aid in the development of improved therapies to treat neuropathic pain, our study suggests that treatment with vit. C + E may be an option to decrease the dosage of drugs used to treat neuropathic pain, and thus, can lead to less side effects of these drugs in patients suffering from neuropathic pain.

#### Acknowledgements

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### References

- Areti, A., Yerra, V.G., Naidu, V., Kumar, A., 2014. Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox Biol.* 18, 289–295.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.
- Bruno, R.S., Leonard, S.W., Atkinson, J., Montine, T.J., Ramakrishnan, R., Bray, T.M., 2006. Faster plasma vitamin E disappearance in smokers is normalized by vitamin C supplementation. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 689–697.
- Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Lee, J.H., Krishna, M.C., Shacter, E., Chovke, P.L., Pooput, C., Kirk, K.L., 2007. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8749–8754.
- De Medinaceli, L., Freed, W.J., Wyatt, R.J., 1982. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol.* 77, 634–643.
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37, 277–285.
- Garelnabi, M., Veledar, E., White-Welkley, J., Santanam, N., Abramson, J., Weintraub, W., Parthasarathy, S., 2012. Vitamin E differentially affects short term exercise induced changes in oxidative stress, lipids, and inflammatory markers. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 22, 907–913.
- Gil, Y.S., Kim, J.H., Kim, C.H., Han, J., Zuo, Z., 2015. Gabapentin inhibits the activity of the rat excitatory glutamate transporter 3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 762, 112–117.
- Guedes, R.P., Bosco, L.D., Teixeira, C.M., Araújo, A.S.R., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Ribeiro, M.F.M., Partata, W.A., 2006. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochem. Res.* 31, 603–609.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Halliwel, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658.
- Hamidi, G.A., Jafari-Sabet, M., Abed, A.R., Mesdaghinia, A., Mahlooji, M., 2014. Banafshe HR. Gabapentin enhances anti-nociceptive effects of morphine on heat cold, and mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Iran J. Basic Med. Sci.* 17, 753–759.
- Hedge, B., Vadnal, P., Sanghavi, J., Korde, V., Kulkarni-Almeida, A.A., Dagia, N.M., 2012. Vitamin E is a MIF inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418, 384–389.
- Jaggi, A.S., Jain, V., Singh, N., 2011. Animal models of neuropathic pain. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25, 1–28.
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange: comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853–856.
- Kiabi, F.H., Soleimani, A., Habibi, M.R., Zeydi, A.E., 2013. Can Vitamin C be used as an adjuvant for managing postoperative pain? A short literature review. *Korean J. Pain* 26, 209–221.
- Kim, M.J., Hong, B.H., Zhang, E.J., Ko, Y.K., Lee, W.H., 2012. Antinociceptive effects of intraperitoneal and intrathecal vitamin E in the rat formalin test. *Korean J. Pain* 25, 238–244.
- Klusáková, I., Dubový, P., 2009. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries—an anatomical perspective. *Ann. Anat.* 191, 248–259.
- Kulkar, A., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A.S., 2013. Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. *Arch. Pharm. Res.* 36, 237–251.
- Libinaki, R., Tesanovic, S., Heal, A., Nikolovski, B., Vinh, A., Widdop, R.E., 2010. Effect of tocopherol phosphate on key biomarkers of inflammation: implication in the reduction of atherosclerosis progression in a hypercholesterolaemic rabbit model. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, 587–592.
- Lu, R., Kallenborn-Gerhardt, W., Geisslinger, G., Schmidtke, A., 2011. Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury. *PLoS One* 6, 1–8.
- Magrinelli, F., Zanette, G., Tamburini, S., 2013. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. *Pract. Neurol.* 13, 292–307.
- Maher, P., 2006. Redox control of neural function: background, mechanisms, and significance. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1941–1970.
- Morani, A.S., Bodhankar, S.L., 2010. Early co-administration of vitamin E acetate and methylcobalamin improves thermal hyperalgesia and motor nerve conduction velocity following sciatic nerve crush injury in rats. *Pharmacol. Rep.* 62, 405–409.
- Nakazato-Imasato, E., Kurebayashi, Y., 2009. Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Life Sci.* 84, 622–626.
- Naziroglu, M., Özgül, C., 2013. Vitamin E modulates oxidative stress and protein kinase C activator (PKA)-induced TRPM2 channel gate in dorsal root ganglion of rats. *J. Bioenerg. Biomembr.* 45, 541–549.
- Nelson, M.T., Joksovic, P.M., Su, P., Kang, H.W., van Deusen, A., Baumgart, J.P., David, L.S., Snutch, T.P., Barrett, P.Q., Lee, J.H., Zorumski, C.F., Perez-Reyes, E., Todorovic, S.M., 2007. Molecular mechanisms of subtype-specific inhibition of neuronal T-type calcium channels by ascorbate. *J. Neurosci.* 27, 12577–12583.
- Okubo, M., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Kanda, H., Dai, Y., Noguchi, K., 2012. Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Mol. Pain* 8, 8.
- Oliveira, B.F., Veloso, C.A., Nogueira-Machado, J.A., Moraes, E.N., Dos Santos, R.R., Cintra, M.T., Chaves, M.M., 2012. Ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene reduce oxidative stress and proinflammatory cytokines in mononuclear cells of Alzheimer's disease patients. *Nutr. Neurosci.* 15, 244–251.
- Park, J.M., Kim, C.K., Lee, H.C., Jung, H., Choi, K.U., Hong, S.W., Lim, D.G., Baek, W.Y., Kwak, K.H., 2013. Antiallostatic effects of vitamin C and vitamin E in chronic post-ischemia pain rat model. *Korean J. Anesthesiol.* 65, 442–448.
- Rice, M.E., 2000. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23, 209–216.
- Santos, F.M., Grecco, L.H., Rocha, P.A., Pereira, M.G., Oliveira, M.E., Silva, J.T., Martins, D.O., Miyabara, E.H., Chacur, M., 2014. The neural mobilization technique modulates the expression of endogenous opioids in the periaqueductal gray and improves muscle strength and mobility in rats with neuropathic pain. *Behav. Brain Funct.* 10, 19.
- Schencking, M., Sandholzer, H., Frese, T., 2010. Intravenous administration of vitamin C in the treatment of herpetic neuralgia: two case reports. *Med. Sci. Monit.* 16, CS58–CS61.
- Stoicea, N., Russell, D., Weidner, G., Durda, M., Joseph, N.C., Yu, J., Bergese, S.D., 2015. Opioid-induced hyperalgesia in chronic pain patients and the mitigating effects of gabapentin. *Front. Pharmacol.* 6, 104.
- Takanaga, H., Mackenzie, B., Hediger, M.A., 2004. Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *PLoS Arch.* 447, 677–682.
- Tiwari, V., Kuhad, A., Chopra, K., 2012. Neuroprotective effect of vitamin E isoforms against chronic alcohol-induced peripheral neurotoxicity: possible involvement of oxidative nitroderivative stress. *Phytother. Res.* 26, 1738–1745.
- Traber, M.G., Stevens, J.F., 2011. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1000–1013.
- Treede, R.D., Jensen, T.S., Campbell, J.N., Cruccu, G., Dostrovsky, J.O., Griffin, J.W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T., Serra, J., 2008. Neuropathic pain:

- redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70, 1630–1635.
- Warzyniak, A., Gornicka, M., Hamulka, J., Gajewska, M., Drywien, M., Pierzynowska, J., Senger, A.G., 2013.  $\alpha$ -Tocopherol, ascorbic acid, and  $\beta$ -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress. *Nutr. Res.* 33, 868–875.
- Wu, D., Hayek, M.G., Meydani, S., 2001. Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. *J. Nutr.* 131, 382S–388S.
- Zeraati, F., Araghchian, M., Farjoo, M.H., 2014. Ascorbic acid interaction with analgesic effect of morphine and tramadol in mice. *Anesth. Pain Med.* 4, e19529.
- van Dam, P.S., Bravenboer, B., van Asbeck, B.S., Marx, J.J., Gispen, W.H., 1999. High rat food vitamin E content improves nerve function in streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 376, 217–222.

## 5.2 ARTIGO 2

Este artigo apresenta o efeito da administração i.p. de vitaminas C, E e C+E, por 3 e 10 dias, sobre a formação de  $O_2^{\bullet-}$  e valores de tióis totais, capacidade antioxidante total, peróxido de hidrogênio, metabólitos do NO e hidroperóxidos lipídicos em medula espinal lombossacral de ratos submetidos à dor neuropática induzida por constrição crônica no nervo isquiático. Este artigo está em análise na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.

**Treatment with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol modulates  
 oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with  
 neuropathic pain**

Journal:	<i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Riffel, Ana Paula; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Santos, Maria do Carmo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Souza, Jessica; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Scheid, Taina; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Horst, Andrea; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Kolberg, Carolina; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Belló-Klein, Adriane; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Partata, Wania; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fisiologia
Keywords:	Total thiol, Superoxide anion generation, Nitric oxide, Lipid hydroperoxides, Hydrogen peroxide, Total antioxidant capacity
Special Sections:	Biomedical Sciences/Neurosciences and Behavior

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Treatment with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol modulates oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain**

Ana Paula K. Riffel<sup>1</sup>, Maria do Carmo Q. Santos<sup>1</sup>, Jéssica A. de Souza<sup>1</sup>, Taína Scheid<sup>1</sup>,  
Andrea Horst<sup>2</sup>, Carolina Kolberg<sup>3</sup>, Adriane Belló-Klein<sup>1</sup>, Wania A. Partata<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Univates, Lajeado, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Centro Universitário da Serra Gaúcha, Caxias do Sul, RS, Brazil.

**Running Title:** Vitamins C and E affects oxidative markers in spinal cord

Correspondence: Ana Paula K. Riffel

Departamento de Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS

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

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

E-mail: anapkr@gmail.com

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60**Abstract**

Vitamin E (vit. E) and vitamin C (vit. C) are antioxidants that inhibits nociception. It is unknown the effect of these vitamins on oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain. This study investigated the effect of intraperitoneal administration of vit. E ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) and vit. C ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), given alone or in combination, on spinal-cord oxidative-stress markers in CCI rats. Adult males Wistar rats weighing 200-250 g were equally divided into the following groups: Naive (rats did not undergo surgical manipulation); Sham (rats in which all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature), and CCI (rats in which four ligatures were tied loosely around the right common sciatic nerve), which received injections of vitamins or vehicle (saline containing 1% Tween 80) for 3 or 10 days ( $n=6/\text{each group}$ ). The vitamins prevented the reduction in total thiol content and the increase in superoxide-anion generation that were found in vehicle-treated CCI rats. While nitric-oxide metabolites increased in vehicle-treated CCI rats 3 days after surgery, these metabolites did not show significant changes in vitamin-treated CCI rats. In all rats, total antioxidant capacity and hydrogen-peroxide levels did not change significantly. Lipid hydroperoxides increased 25% only in vehicle-treated CCI rats. These changes may contribute to vit. C and vit. E-induced antinociception, because scavenging ROS seems to help normalize the spinal-cord oxidative status altered by pain.

*Key words:* Total thiol; Superoxide anion generation; Nitric oxide; Lipid hydroperoxides; Hydrogen peroxide; Total antioxidant capacity

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Introduction

Neuropathic pain, which arises as a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system, affects 6.0–10% of the population and negatively impacts the quality of life (1). The pathophysiological mechanisms of this pain are not fully understood. The lack of effective analgesics has impelled a continuing search to find novel molecules that have beneficial effects in the management of neuropathic pain. Since reactive oxygen species (ROS), which include superoxide radicals, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitric oxide (NO) and peroxynitrite play an important role in neuropathic pain (2), antioxidant agents have been tested to treat this pain (3,4).

Recently, we demonstrated that treatment with a combination of vitamin C (vit. C) plus vitamin E (vit. E), which are potent dietary antioxidants (5), was more effective in treating chronic constriction injury (CCI)-induced neuropathic pain than these vitamins individually, which also showed an antinociceptive effect when given alone (6). In addition, these authors showed that co-administration of vit. C plus vit. E and gabapentin (an analgesic to treat neuropathic pain) induced a greater antinociceptive effect than gabapentin alone. Rats with CCI are one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain, as CCI simulates the symptoms of chronic nerve compression that correspond to causalgia or complex regional pain syndrome in human patients (7).

According to Riffel et al. (4), the administration of vits. C plus E induced changes in oxidative parameters in the injured sciatic nerve. In CCI rats that received the combination of vitamins, the total antioxidant capacity (TAC) increased (45%), while lipid hydroperoxide levels (a marker of pro-oxidant status) decreased (38%). However, this study did not assess oxidative parameters in the lumbosacral spinal cord, the region where most afferent fibers of the sciatic nerve enter. Evidence suggests that the main action site for ROS in neuropathic

1  
2  
3  
4 pain is the spinal cord (7). In addition, vit. E is a potent lipophilic chain-breaking antioxidant,  
5  
6 found in biological membranes (8). Its most active isomer,  $\alpha$ -tocopherol, is rapidly depleted  
7  
8 in the body, requiring regeneration through other antioxidants present in the water-soluble  
9  
10 portion of the cell, such as ascorbate (the monovalent anion of vit. C) (9). Ascorbate readily  
11  
12 penetrates the central nervous system after oral administration (10). We postulated that the  
13  
14 analgesic effect of vits. C and E, alone or in combination, would involve modulation of ROS  
15  
16 in the lumbosacral spinal cord. Therefore, our study assessed the effect of intraperitoneal  
17  
18 (i.p.) administration of vit. C ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), vit. E ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), and vit. C plus  
19  
20 vit. E (vits. C+E) in the same doses, given for 3 and 10 days, on the total content of thiols and  
21  
22 TAC, as markers of antioxidant status, in the lumbosacral spinal cord of rats with CCI. We  
23  
24 also assessed the superoxide-anion generation (SAG) and the levels of lipid hydroperoxides,  
25  
26  $\text{H}_2\text{O}_2$  and NO metabolites in this tissue, as markers of pro-oxidant status.  
27  
28  
29  
30  
31  
32

### 33 **Materials and methods**

#### 34 **Experimental animals and treatment**

35  
36  
37 All animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal  
38  
39 Experimentation of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS  
40  
41 #23352). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of  
42  
43 animals used. Adult male Wistar rats, weighing 200-250 g, were divided into three  
44  
45 experimental groups (naive, sham and CCI), and each was further divided into four  
46  
47 subgroups (n=12/subgroup), which received vit. C ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$  – L-Ascorbic Acid,  
48  
49 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), vit. E ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$  – DL-alpha-tocopherol  
50  
51 acetate, Sigma Chemical Co.), a combination of these vitamins in the same doses (vits. C+E)  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

(4,11) or vehicle for 3 and 10 days (n=6/each treatment). The vitamins were freshly prepared in saline containing 1% Tween 80 (Merck) which was used as the vehicle. The administration started on the day of surgery (after recovery from anesthesia) and was performed daily at 17:00 h by the same researcher (4).

### Induction of peripheral neuropathy by CCI

CCI was performed based on the procedure described by Bennett and Xie (12), with slight modifications according to Riffel et al. (4). After anesthesia (90 mg·kg<sup>-1</sup> ketamine and 10 mg·kg<sup>-1</sup> xylazine), the right common sciatic nerve was exposed via a mid-thigh incision. Proximal to the sciatic trifurcation, the nerve was freed of adhering tissue for about 7 mm, and four ligatures (4.0 chromic catgut, Shalon Fios Cirúrgicos LTDA, São Luis de Montes Belos, Brasil) were tied loosely around it, with a 1,0-1.5 mm interval between each ligature. After nerve ligation, the muscle and skin layer was immediately sutured with thread and a topical antibiotic applied. To expose the sciatic nerve in sham rats, all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature.

### Sample preparation

Rats were killed by decapitation and their lumbosacral spinal cord was promptly dissected out and divided transversely into three parts. The same portion always received the same preparation. Two parts were cooled in liquid nitrogen and processed to determine SAG and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A third part was homogenized in 1.15% KCl diluted 1:5 (w/v) containing 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, centrifuged at 1000 x g for 20 min at 4 °C, and the

1  
2  
3  
4 supernatant was used for assays of total thiols, TAC, lipid hydroperoxides levels and NO  
5  
6 metabolites.  
7  
8  
9

#### 10 **Determination of total thiol levels**

11  
12  
13  
14 The total thiol content was determined as described by Aksenov and Markesbery (13).  
15 Briefly, 30  $\mu$ L of a sample was mixed with 1 mL of phosphate/EDTA buffer (pH = 7.5) and  
16  
17 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB, 10 mM). Control samples, which did not include  
18  
19 DTNB, were run simultaneously. After 30 min of incubation at room temperature, the  
20  
21 absorbances were read at 412 nm. Results were expressed as mmol/mg tissue.  
22  
23  
24  
25  
26  
27

#### 28 **Determination of TAC**

29  
30  
31  
32 The TAC was determined with 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid  
33  
34 radical cation (ABTS<sup>•+</sup>), which in an acid medium is decolorized by antioxidants, according  
35  
36 to their concentration and antioxidant capacity (14). Results are expressed in  $\mu$ mol $\cdot$ eq trolox<sup>-</sup>  
37  
38  $\cdot$ g tissue<sup>-1</sup>.  
39  
40  
41  
42  
43

#### 44 **Estimation of superoxide anion generation (SAG)**

45  
46  
47 The lumbosacral spinal cord SAG was estimated by using the reduced nitroblue  
48  
49 tetrazolium (NBT) method of Wang et al. (15). Briefly, sections of fresh tissue from the  
50  
51 lumbosacral spinal cord reacted with NBT to form formazan as an index of superoxide anion  
52  
53 generation. The absorbance of formazan was determined spectrophotometrically at 540 nm.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The quantity of NBT reduction =  $A \times V / (T \times Wt \times \epsilon \times l)$ , where A is the absorbance of blue formazan at 540 nm, V is the volume of the solution, T is the time period (90 min) during which the rings were incubated with NBT, Wt is the blotted wet weight of the spinal cord portion,  $\epsilon$  is the extinction coefficient of blue formazan (i.e., 0.72 l/mmol/mm), and l is the length of the light path. Results were reported as reduced NBT  $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg tissue}^{-1}$ .

#### Determination of $\text{H}_2\text{O}_2$

The assay was based on horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red by  $\text{H}_2\text{O}_2$ , leading to the formation of a compound that absorbs at 610 nm. Sections of fresh tissue from the lumbosacral spinal cord were incubated for 30 min at 37 °C in 10 mmol/L phosphate buffer (140 mmol/L NaCl and 5 mmol/L dextrose). The supernatants were transferred to tubes with 0.28 mmol/L phenol red and 8.5 U/mL HRPO. After 5 min incubation, 1 mol/L NaOH was added, and the solution was read at 610 nm. The results were expressed in  $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{g tissue}$  (16).

#### Determination of lipid hydroperoxides levels

The lipid hydroperoxides were measured by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  by LOOH in an acid medium containing xylenol orange dye, which forms a complex with  $\text{Fe}^{3+}$ , as described by Jiang et al. (17). Results are expressed in  $\mu\text{mol/g tissue}$ .

#### Determination of NO metabolites

1  
2  
3  
4 To measure NO metabolites, nitrites (NO<sub>2</sub>) were determined using the Griess reagent, in  
5 which a chromophore with a strong absorbance at 540 nm is formed by reaction of NO<sub>2</sub> with  
6 a mixture of 0.1% naphthylethylenediamine and 1% sulfanilamide. Nitrates (NO<sub>3</sub>) were  
7 determined as total NO<sub>2</sub> (initial NO<sub>2</sub> plus NO<sub>2</sub> reduced from NO<sub>3</sub>) after their reduction using  
8 NO<sub>3</sub> reductase from *Aspergillus* species in the presence of nicotinamide dinucleotide  
9 phosphate acid. A standard curve was established with a set of serial dilutions (10<sup>-8</sup> to 10<sup>-3</sup>  
10 mol/L) of sodium NO<sub>2</sub>. Absorbance at 540 nm was obtained (spectrophotometer, Zenyth 200;  
11 Anthos, Eugendorf, Austria). Results were expressed as mmol/L (18).  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

#### 23 24 **Statistical analysis**

25  
26  
27  
28 All data are shown as mean±SEM of the values of six animals. The results were analyzed  
29 using two-way ANOVA (factors: lesion and treatment) followed by Tukey post-hoc test.  
30 Differences were considered statistically significant when *p* was <0.05. Statistical analyses  
31 were carried out with the software Statistica 7.0.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

#### 39 **Results**

40  
41  
42  
43  
44 After CCI, all rats exhibited a decrease in mechanical threshold (a measure to assess  
45 sensitivity to pain), which was prevented by vitamins treatment, showed in our previous  
46 study (4).  
47  
48  
49  
50  
51  
52

#### 53 **Antioxidant parameters**

54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 After CCI, the vehicle-treated rats showed significant decreases in the total thiol content at  
5 days 3 and 10. At day 3, the reduction was 52.5% ( $p=0.008$ ) compared to naive rats, but it  
6 was 43% ( $p=0.032$ ) compared to sham rats. In vitamins-treated CCI rats, the total thiol  
7 content increased 99% ( $p=0.0009$ ), 100% ( $p=0.0010$ ) and 106% ( $p=0.0007$ ) in vit. C, vit. E  
8 and vits. C+E CCI rats, respectively, compared to vehicle-treated CCI rats for 3 days (Figure  
9 1a). At day 10, the total thiol content did not shown significant change in spinal cord of  
10 vehicle-treated CCI rats compared to naive and sham rats, but it was decreased by around  
11 20% and 33% in spinal cord of vehicle-treated CCI rats compared to naive and sham rats,  
12 respectively (Figure 1b). In vitamins-treated CCI rats, the total thiol content was similar to  
13 found in naive and sham rats, but it showed significant increase compared to vehicle-treated  
14 CCI rats of the same experimental group. The increase was 55.5% ( $p=0.0275$ ), 53.5%  
15 ( $p=0.0188$ ) and 66% ( $p=0.0037$ ) in vit. C, vit. E and vits. C+E-treated CCI rats, respectively.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 The TAC showed no significant changes in the spinal cord of the vitamins and vehicle-  
31 treated CCI rats (Figure 2a and b). The total thiol content and TAC did not change  
32 significantly in the naive and sham rats.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

#### 40 Pro-oxidant parameters

41  
42  
43 The level of SAG increased significantly in the lumbosacral spinal cord of vehicle-treated  
44 CCI rats. The increase was 157% compared to naive rats, and was found at days 3 ( $p=0.0001$ )  
45 and 10 ( $p=0.0001$ ) (Figure 3a and b). In vitamin-treated CCI rats, an increase was found only  
46 in vit. C-treated CCI rats for 3 days ( $p=0.0005$ ). Rats that received vit. E and vits. C+E for 3  
47 days showed SAG levels that were similar to those found in naive rats. The vit.E and vits.  
48 C+E-treated CCI rats showed significant decrease in SAG levels compared to vehicle-treated  
49 CCI rats of the same experimental group ( $p=0.01856$  and  $p=0.04268$  for vit. E and vits  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 C+E-treated CCI rats, respectively). At day 10 post-CCI, all rats that received vitamins  
5 showed SAG levels that were similar to those found in naive rats. The SAG levels decreased  
6  
7  
8 53% ( $p=0.0001$ ), 44% ( $p=0.0003$ ) and 55% ( $p=0.0001$ ) in CCI rats that received vit. C, vit. E  
9  
10 or a combination of vits. C+E, respectively, compared to vehicle-treated CCI rats of the same  
11  
12 experimental group. In sham rats, the level of SAG increased only in rats that received  
13  
14 vehicle for 3 days compared to naive rats and vitamin-treated sham rats ( $p<0.05$ ). No  
15  
16 significant change in the levels of SAG was found in naive rats.  
17

18  
19 The  $H_2O_2$  levels showed no significant changes at the time points assessed (Figure 4a and  
20  
21 b). The lipid hydroperoxides showed no significant changes in the spinal cord of vehicle-  
22  
23 treated CCI rats (Figure 5a and b). However, the lipid hydroperoxides increased by around  
24  
25 25% in these rats at days 3 and 10 compared to naive rats. This increase was not observed in  
26  
27 CCI rats that received vitamins. At day 3, while lipid hydroperoxides did not shown  
28  
29 significant change in spinal cord of vit. C and vit. E-treated CCI rats, the levels significantly  
30  
31 reduced (43%,  $p=0.0289$ ) in vits. C+E-treated CCI rats compared to vehicle-treated CCI rats  
32  
33 of the same experimental group. At day 10, the lipid hydroperoxides significantly decreased  
34  
35 (43%) in spinal cord of vit. E and vits. C+E-treated CCI rats ( $p=0.0021$  and  $p=0.0021$ ,  
36  
37 respectively) compared to vehicle-treated CCI rats of the same experimental group. Despite  
38  
39 no significant, the lipid hydroperoxides decreased 33% in spinal cord of vit. C-treated CCI  
40  
41 rats. No significant change was found in sham and naive rats.  
42  
43  
44

45  
46 The NO metabolites increased 90% ( $p=0.0198$ ) in the spinal cord of CCI rats that received  
47  
48 the vehicle for 3 days, compared to naive and sham rats (Figure 6a). At day 10, this increase  
49  
50 was not observed (Figure 6b). In the spinal cord of the vitamin-treated CCI rats, the level of  
51  
52 NO metabolites was similar to that found in naive rats at both time points. No significant  
53  
54 change was found in sham and naive rats.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Discussion

The first question to be clarified in our study is the decision to use the rat as an experimental model, even though rats can synthesize their own ascorbic acid (19). Despite this characteristic, rats are frequently used as an experimental model to study the effects of treatment with vit. C on nerve tissue (4,20,21). These animals are also the most frequently used laboratory animals for experimental models of peripheral neuropathic pain (6). Therefore, the rat is a valid model to study the effect of treatment with vit. C on neuropathic pain, a treatment that still has many unanswered questions.

Our study focused on effects of vit. C and vit. E, given alone or in combination, on oxidative-stress parameters in the spinal cord of CCI rats, because of the emerging role of ROS in pain mechanisms (2,22). While the vehicle-treated CCI rats showed a decrease in total thiol content, this reduction was not found in the vitamin-treated CCI rats. Decreased glutathione, the most abundant thiol in mammals, was also observed by other investigators in the spinal cord of CCI rats (23). Total thiols constitute a group of molecules that act as cofactors in some enzymatic systems, and they can directly neutralize radicals (24). The observed decrease in total thiols could be due to their depletion as a result of the increased production of ROS in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats. ROS can mediate the occurrence and maintenance of neuropathic pain (2,7). The lack of a decrease in total thiol content of the vitamin-treated CCI rats may be related to the antioxidant role of the vitamins. Bütün et al. (25) demonstrated that vit. E had protective effect on the glyceryl trinitrate-induced brain injury by inhibiting free radical production, regulation of calcium-dependent process, and supporting the antioxidant redox system. Vit. C directly acts to scavenge oxygen- or nitrogen-based radical species generated during cellular metabolism (26). In addition, vit. C transforms vit. E to its active form (25,27). Therefore, it appears valid to

1  
2  
3  
4 suggest that the antioxidant activity of the vitamins prevented the decrease in total thiol  
5  
6 content of the spinal cord.  
7

8  
9  
10 Interestingly, TAC did not change significantly in the spinal cord of the vitamin-treated  
11 rats. We suggest that this result may be related to tight control of the vitamins to ensure a  
12 pro-oxidant state in these animals. According to Poljsak et al. (28), excessive ROS formation  
13 needs to be corrected only to prevent the accumulation of oxidative damage, and a slight pro-  
14 oxidative balance is necessary for optimal cell-signaling processes. At low levels, free  
15 radicals modulate the activities of different transcription factors and protein-signaling  
16 cascades (29). However, TAC did not change in the spinal cord of the vehicle-treated CCI  
17 rats, which showed a decrease in total thiols. It has been demonstrated that TAC represents  
18 the enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds in the body such as superoxide  
19 dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione (30). CCI increases catalase  
20 activity in the spinal cord 3 and 10 days after surgery (31). Catalase is an antioxidant enzyme,  
21 located in peroxisomes, which catalyzes the breakdown of  $H_2O_2$  to  $H_2O$  and  $O_2$  (2). The  
22 increase in catalase activity may be related to a lack of significant change in TAC in the  
23 spinal cord of the vehicle-treated CCI rats.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39  
40 In our study, administration of vitamins reduced the levels of SAG in the spinal cord of  
41 the CCI rats, which increased in the vehicle-treated CCI rats. It has been demonstrated that  
42 vit. C and vit. E decreases the superoxide anion concentration and the activation of the  
43 NADPH oxidase, the major source of superoxide anions (32). Thus, these effects of vitamins  
44 may be contributing to decreased level of SAG in the spinal cord of the vitamins-treated CCI  
45 rats. However, while the vit. E and vit. C+E-treated CCI rats showed reductions in these  
46 levels at days 3 and 10, the vit. C-treated CCI rats showed a decrease only at day 10. This  
47 difference may be related to pro-oxidant properties of vit. C. Ascorbate readily undergoes  
48 pH-dependent autoxidation, producing  $H_2O_2$  (33). This appears to occur because parenteral  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

administration bypasses tight control of ascorbate, which is restored as the kidneys excrete ascorbate when concentrations are higher than those corresponding to  $V_{max}$  of the reabsorptive transporters (33). According to these authors, when tight control of ascorbate is bypassed,  $H_2O_2$  forms in the extracellular space; and as tight control is restored,  $H_2O_2$  formation ceases. Our results suggest that tight control of vit. C was restored at day 10, but not at day 3. The lack of change in  $H_2O_2$  levels may be related to activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase. Superoxide dismutase converts superoxide to  $H_2O_2$  (2), which is breakdown by catalase, as discussed above. Furthermore It has been demonstrated that vit. C modulates superoxide dismutase activity (33). Although our study did not assess the activities of antioxidant enzymes, it appears important to determine the effect of vitamins on activities of these enzymes in spinal cord of CCI rats.

The increase in SAG levels in vehicle-treated CCI rats at 3 and 10 days may be related to neuropathic pain. Significant evidence links the superoxide anion to pain of several etiologies, including neuropathic pain (2,34). Recently we demonstrated that CCI rats that received the same vehicle used in the present study did not exhibit recovery in the mechanical threshold 3 and 10 days after the surgery. However, vitamins-treated CCI rats showed antinociception in these time points (4). In addition, vit. C ameliorates pain in humans (35). The antinociceptive effect may be related to antioxidant actions of the vitamins discussed above. It has been suggested that restoring nitrosative balance in peripheral and central nervous system is a possible therapeutic approach for ameliorating neuropathology (2). This suggestion do not exclude others functions of vitamins that could be contributing to antinociception. Vit. E regulates calcium-dependent process (25), and vit. C has a function as cofactor for biosynthesis of amidated opioids peptides and a family of biosynthetic and regulatory metallo-enzymes (35). All these mechanisms may be involved in the vitamins-induced antinociception, as well as antioxidant actions of the vitamins.

1  
2  
3  
4 Our study also showed that vitamins, given alone or in combination, prevented the  
5  
6 increase in NO metabolites in the spinal cord, which were increased in vehicle-treated CCI  
7  
8 rats after 3 days. The increase in NO metabolites at day 3, but not at day 10 was also found  
9  
10 by other authors (3). The lack of this increase in the spinal cord of vitamin-treated CCI rats  
11  
12 may be related to the modulating effect of vit. C and vit. E on calcium channels. NO  
13  
14 formation is induced by nitric-oxide synthase activation in a calcium/calmodulin-dependent  
15  
16 manner following stimulation of calcium-permeable N-methyl-d-aspartate (NMDA)  
17  
18 receptors (36). Vit. E modulates the activation of the oxidative stress-induced melastatin-like  
19  
20 transient receptor potential 2 (TRPM2) channel, which is an oxidative redox-sensitive  
21  
22 calcium-permeable cation channel (37). Vit. C inhibits the  $C_{av}3.2$  isoform of T-type calcium  
23  
24 channels involved in neuropathic pain (38). These actions of vit. C and vit. E may help to  
25  
26 prevent the increase in the NO metabolites in the spinal cord of the vitamin-treated CCI rats.  
27  
28 The increase in NO metabolites in the spinal cord of the vehicle-CCI rats may be related to  
29  
30 the role of NO in neuropathic pain. NO is an important neurotransmitter involved in the  
31  
32 nociceptive process, which is increased in rats with neuropathic pain (39). The reduction in  
33  
34 total thiol content may also be related to the increase in NO. Glutathione plays an important  
35  
36 role in NO availability. Glutathione reacts with peroxynitrite from S-nitrosothiols, which  
37  
38 subsequently release NO over a prolonged period to extend the half-life of NO (40). The  
39  
40 reaction of glutathione with peroxynitrite may also have contributed to the decrease in total  
41  
42 thiols.  
43  
44  
45  
46  
47

48 The effects of the vitamins discussed above may have contributed to the decrease in lipid  
49  
50 hydroperoxides in the spinal cord of the vitamin-treated CCI rats compared to the vehicle-  
51  
52 treated CCI rats. The small increase in the lipid hydroperoxides in the spinal cord of vehicle-  
53  
54 treated CCI rats may be related to increased levels of SAG and NO found in these rats. Since  
55  
56 excessive ROS formation needs to be corrected only to prevent the accumulation of oxidative  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

damage (29), this may explain the small increase in lipid hydroperoxides.

The lack of significant change in  $H_2O_2$  may be also related to the effects of these vitamins as antioxidants and/or modulators of calcium channels, as discussed above. The lack of change in  $H_2O_2$  of vehicle-treated CCI rats may be related to an increase in catalase activity in the spinal cord of rats with CCI (31).

The increase in the levels of SAG in the spinal cord of vehicle-treated sham rats may be due to the procedures involving manipulation of deep tissues, such as muscles and adjacent connective tissue, which induce pain (3,22). Since administration of vitamins C and E, given alone or in combination, induced an antinociceptive effect in these animals, this result may be related to antioxidant actions of these vitamins discussed above. In addition, the effect of the vitamins in sham rats reinforces the vitamins-induced antinociception in pain conditions.

In conclusion, this study provided evidence that administration of vitamins C and E, given alone or in combination, prevents changes in pro-oxidant and antioxidant markers in the spinal cord of CCI rats, because while CCI induced increase in the SAG and NO metabolites and decreased the total thiol content, these changes was not found in the spinal cord of CCI rats that received vitamins. Since a previous study showed that the same protocol of treatment with vitamins C and E induced antinociception in CCI rats (4), the findings of the current study may be contributing to the antinociceptive effect of these vitamins, because scavenging ROS appears to present an opportunity to help to normalize the spinal-cord oxidative status altered by pain.

#### Acknowledgements

1  
2  
3  
4 This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado  
5 do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento  
6 Científico e Tecnológico (CNPq).  
7  
8  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Review Only

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### References

1. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 16: 17002.
2. Grace PM, Gaudet AD, Staikopoulos V, Maier SF, Hutchinson MR, Salvemini D, et al. Nitroxidative signaling mechanisms in pathological pain. *Trends Neurosci* 2016; 39: 862–879.
3. Horst A, Kolberg C, Moraes MS, Finamor IA, Belló-Klein A, Pavanato MA, et al. Effect of N-acetylcysteine on the spinal-cord glutathione system and nitric-oxide metabolites in rats with neuropathic pain. *Neurosc Lett* 2014; 569: 163-168.
4. Riffel AP, de Souza JA, Santos M C, Horst A, Scheid T, Kolberg C, et al. Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Brain Res Bull* 2016; 121: 169-177.
5. Wawrzyniak A, Górnicka M, Hamulka J, Gajewska M, Drywień M, Pierzynowska J, et al.  $\alpha$ -Tocopherol, ascorbic acid and  $\beta$ -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress. *Nutr Res* 2013; 33:868–875.
6. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25: 1-28.
7. Kim HY, Lee I, Chun S W, Kim HK. Reactive oxygen species donors increase the responsiveness of dorsal horn neurons and induce mechanical hyperalgesia in rats. *Neural Plast* 2015; 2015.
8. Bruno RS, Leonard SW, Atkinson J, Montine TJ, Ramakrishnan R, Bray TM. Faster plasma vitamin E disappearance in smokers is normalized by vitamin C supplementation. *Free Radic Bio Med* 2006; 40:689–697.

- 1  
2  
3  
4 9. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*  
5  
6 2006; 97:1634–1658.  
7
- 8  
9 10. Kontush A, Mann U, Arlt S, Ujeyl A, Lührs C, Müller-Thomsen T, et al. Influence of  
10  
11 vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's  
12  
13 disease. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:345–354.  
14
- 15 11. Lu R, Kallenborn-Gerhardt W, Geisslinger G, Schmidtko A. Additive antinociceptive  
16  
17 effects of a combination of vitamin c and vitamin e after peripheral nerve injury. *Plos One*  
18  
19 2011; 6:1–8.  
20
- 21 22. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain  
22  
23 sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33: 87-107.  
24
- 25 26. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione  
26  
27 redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci*  
28  
29 *Lett* 2001; 302:141–145.  
30
- 31 32. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity  
32  
33 using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277–  
34  
35 285.  
36
- 37 38. Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, et al. Superoxide anion  
38  
39 from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ. Res* 1998;  
40  
41 82:810–818.  
42
- 43 44. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen  
44  
45 peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161–170.  
46
- 47 48. Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  
47  
48 Fe+2 in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an  
49  
50 iodometric method. *Lipids* 1991; 26: 853-856.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

18. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 1996; 268:142–151.
19. Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 2000; 23:209–216.
20. Lee JY, Choi HY, Yune TY. Fluoxetine and vitamin C synergistically inhibits blood-spinal cord barrier disruption and improves functional recovery after spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2016; 109:78–87.
21. Li L, Zhang Y, Hao J, Liu J, Yu P, Ma F, et al. Online electrochemical system as an in vivo method to study dynamic changes of ascorbate in rat brain during 3-methylindole-induced olfactory dysfunction. *Analyst* 2016; 141:2199–2207.
22. Scheid T, Bosco LD, Guedes RP, Pavanato MA, Belló-Klein A, Partata WA. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochem Res* 2013; 38: 935-942.
23. Bhat RA, Lingaraju MC, Pathak NN, Kalra J, Kumar D, Tandan SK. Effect of ursolic acid in attenuating chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2016; 6: 517–528.
24. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:916–921.
25. Bütün A, Nazıroğlu M, Demirci S, Çelik Ö, Uğuz AC. Riboflavin and vitamin E increase brain calcium and antioxidants, and microsomal calcium-ATP-ase values in rat headache models induced by glyceryl trinitrate. *J Membr Biol* 2015; 248:205-213.
26. Harrison FE, May JM. Vitamin C function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter (SVCT2). *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 719-730.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
27. Daiber A, Daub S, Bachschmid M, Schildknecht S, Oelze M, Steven S, et al. Protein tyrosine nitration and thiol oxidation by peroxynitrite-strategies to prevent these oxidative modifications. *Int J Mol Sci* 2013; 14:7542–7570.
28. Poljsak B, Suput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 1-11.
29. Kaminsky VO, Zhivotovsky B. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21:86–102.
30. Şahin A, Erten S, Altunoğlu A, Işıkoğlu S, Neşelioğlu S, Ergin M, et al. Comparison of serum oxidant and antioxidant parameters in familial Mediterranean fever patients with attack free period. *Acta Reumatol Port* 2014; 39: 316–321.
31. Goecks CSB, Horst A, Moraes MS, Scheid T, Kolberg C, Bello-Klein A, et al. Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction of the sciatic nerve. *Neurochem Res* 2012; 37: 1952-1958.
32. Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 2001; 38: 606-611.
33. Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E, et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:8749–8754.
34. Little JW, Doyle T, Salvemini D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids* 2010; 42:75–94.
35. Carr AC, McCall C. The role of vitamin C on the treatment of pain: new insights. *J Transl Med* 2017; 15: 77.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

36. Mukherjee P, Cinelli MA, Kang S, Silverman RB. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chem Soc Rev* 2014; 43:6814–6838.
37. Nazıroğlu M, Özgül C. Vitamin E modulates oxidative stress and protein kinase C activator (PMA)-induced TRPM2 channel gate in dorsal root ganglion of rats. *J Bioenerg Biomembr* 2013; 45:541–549.
38. Nelson MT, Joksovic PM, Su P, Kang HW, Van Deusen A, Baumgart JP. Molecular Mechanisms of Subtype-Specific Inhibition of Neuronal T-Type Calcium Channels by Ascorbate. *J Neurosci* 2007; 27:12577–12583.
39. Zhou Z, Liang Y, Deng F, Cheng Y, Sun J, Guo L, et al. Phosphorylated neuronal nitric oxide synthase in neuropathic pain in rats. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 10:12748 –12756.
40. Robaczewska J, Kedziora-kornatowska K, Kozakiewicz M, Zary-Sikorska E, Pawluk H, Pawliszak W, et al. Role of glutathione metabolism and glutathione-related Antioxidant defense systems in hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2016; 67:331–337.

### Figure Legends

**Figure 1.** Total thiol content in the spinal cord of rats treated with vit. C ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), vit. E ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), a combination of these vitamins (vits. C+E) in the same doses, or the vehicle alone (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (**a**) and 10 (**b**) days. Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n= 6/\text{group}$ ). \* indicates a significant difference compared to naive and sham rats and vitamin-treated CCI rats over the same experimental period. # indicates a significant difference compared to vitamin-treated CCI rats over the same experimental period ( $P < 0.05$ ; two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test)

**Figure 2.** Total antioxidant capacity (TAC) in the spinal cord of rats treated with vit. C ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), vit. E ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), a combination of these vitamins (vits. C+E) in the same doses, or the vehicle alone (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (**a**) and 10 (**b**) days. Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n= 6/\text{group}$ ). No statistical difference between groups was found on TAC

**Figure 3.** Superoxide anion generation (SAG) in the spinal cord of rats treated with vit. C ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), vit. E ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), a combination of these vitamins (vits. C+E) in the same doses, or the vehicle alone (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (**a**) and 10 (**b**) days. Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n= 6/\text{group}$ ). \* indicates a significant difference compared to naive and sham rats and vitamin-treated CCI rats over the same experimental period. \*\* indicates a significant difference compared to naive rats and vitamin-treated sham rats over the same experimental period. \*\*\* indicates a significant difference compared to naive rats and vit. C and vit. C+E-treated sham rats over

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

the same experimental period. # indicates a significant difference compared to naive rats, vitamins-treated sham rats, and vit. E and vits. C+E -treated CCI rats over the same experimental period ( $P < 0.05$ ; two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test)

**Figure 4.** Hydrogen peroxide levels in the spinal cord of rats treated with vit. C ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), vit. E ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), a combination of these vitamins (vits. C+E) in the same doses, or the vehicle alone (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (a) and 10 (b) days. Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n= 6/\text{group}$ ). No statistical difference between groups was found on  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels

**Figure 5.** Lipid hydroperoxides levels in the spinal cord of rats treated with vit. C ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), vit. E ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), a combination of these vitamins (vits. C+E) in the same doses, or the vehicle alone (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (a) and 10 (b) days. Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n= 6/\text{group}$ ). \* indicates a significant difference compared to vehicle-treated CCI rats over the same experimental period. ( $P < 0.05$ ; two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test)

**Figure 6.** Nitric oxide metabolites ( $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ) in the spinal cord of rats treated with vit. C ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), vit. E ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), a combination of these vitamins (vits. C+E) in the same doses, or the vehicle alone (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (a) and 10 (b) days. Data represent mean  $\pm$  SEM ( $n= 6/\text{group}$ ). \* indicates a significant difference compared to naive and sham rats and vit. C and vits. C+E-treated CCI rats over the same experimental period ( $P < 0.05$ ; two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test)

Figure 1

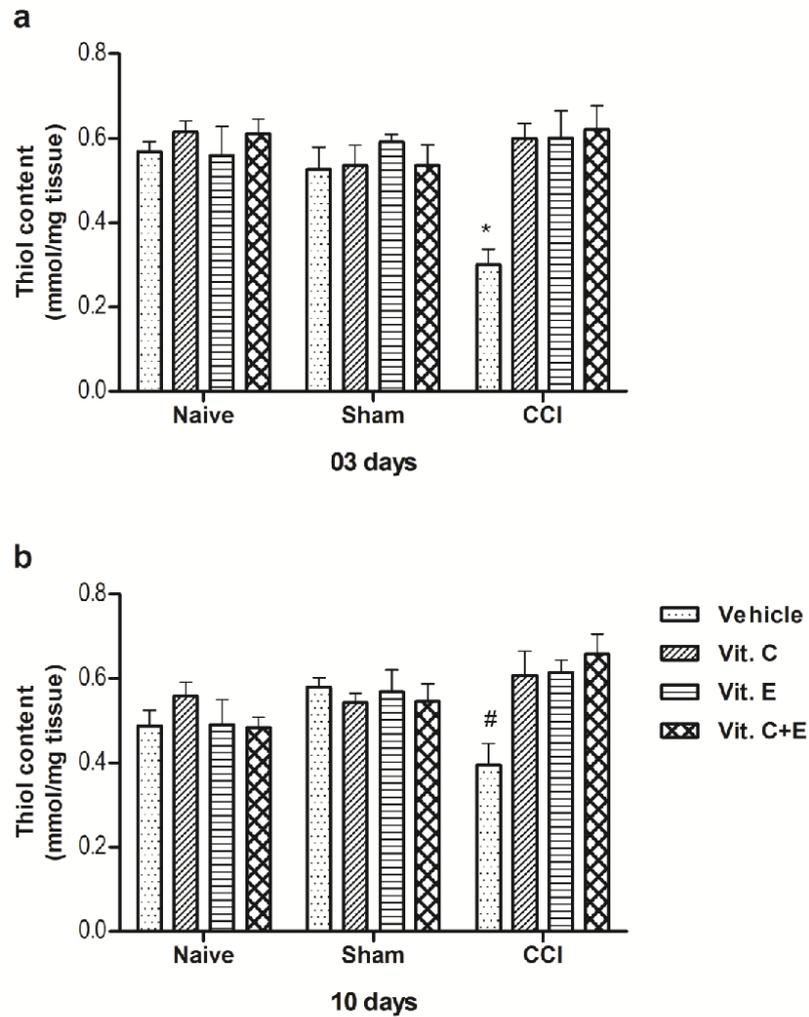


Figure 2

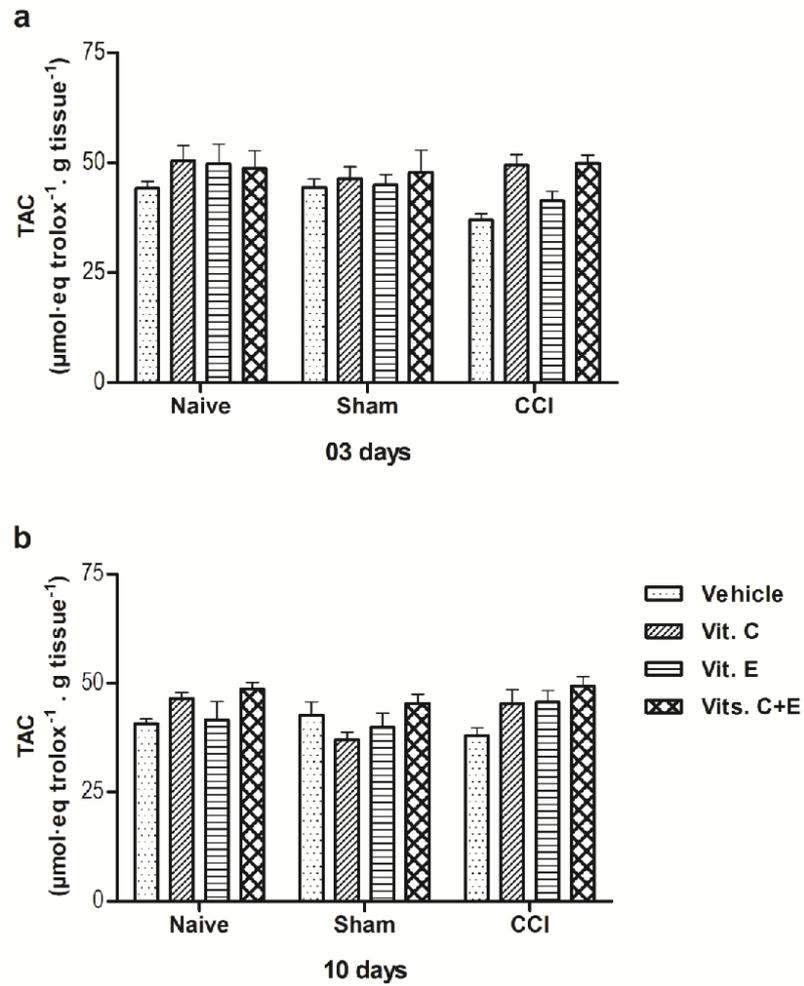


Figure 3

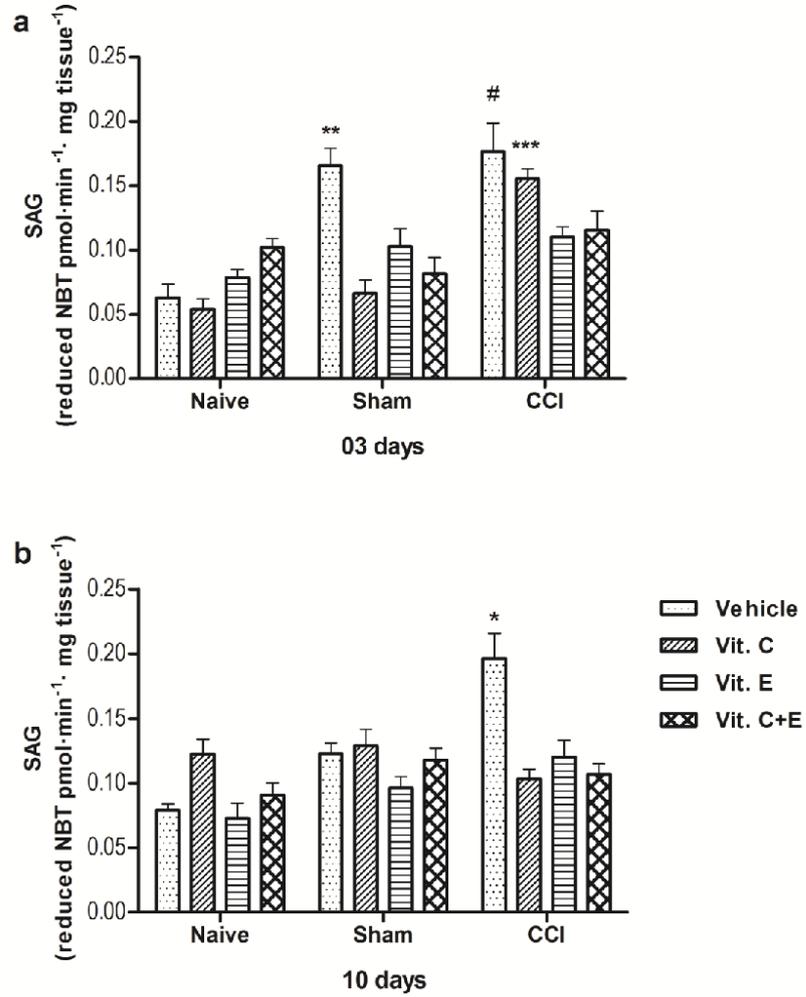


Figure 4

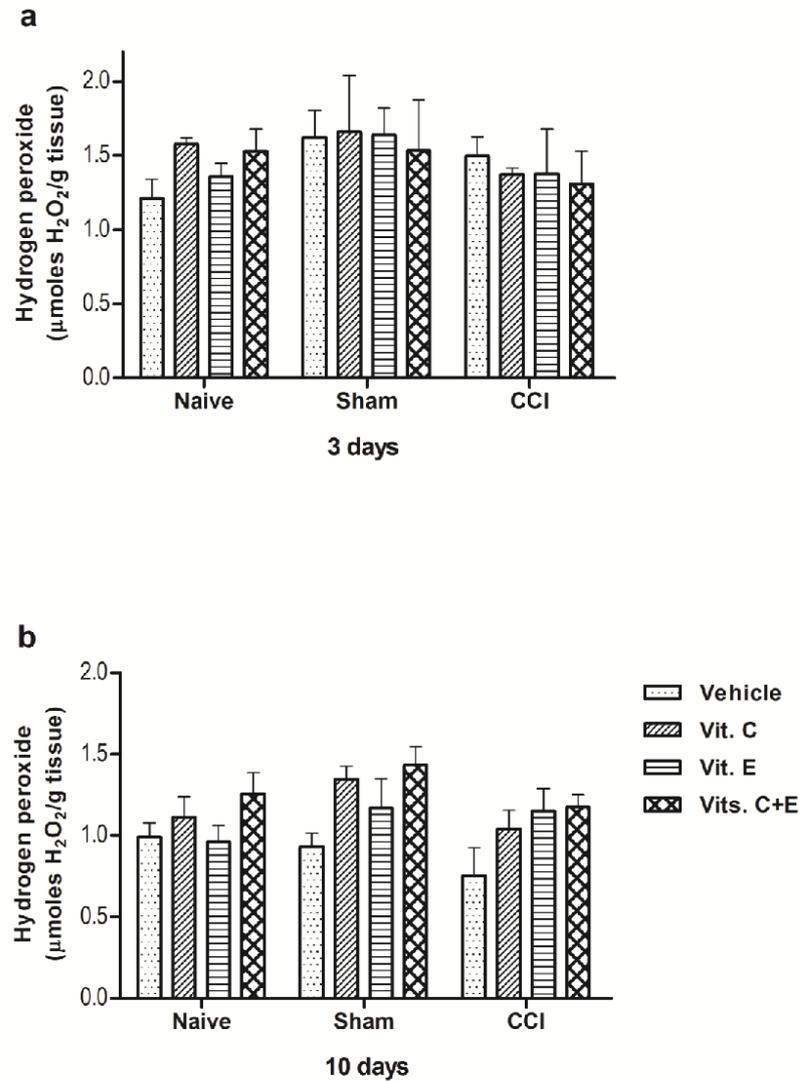
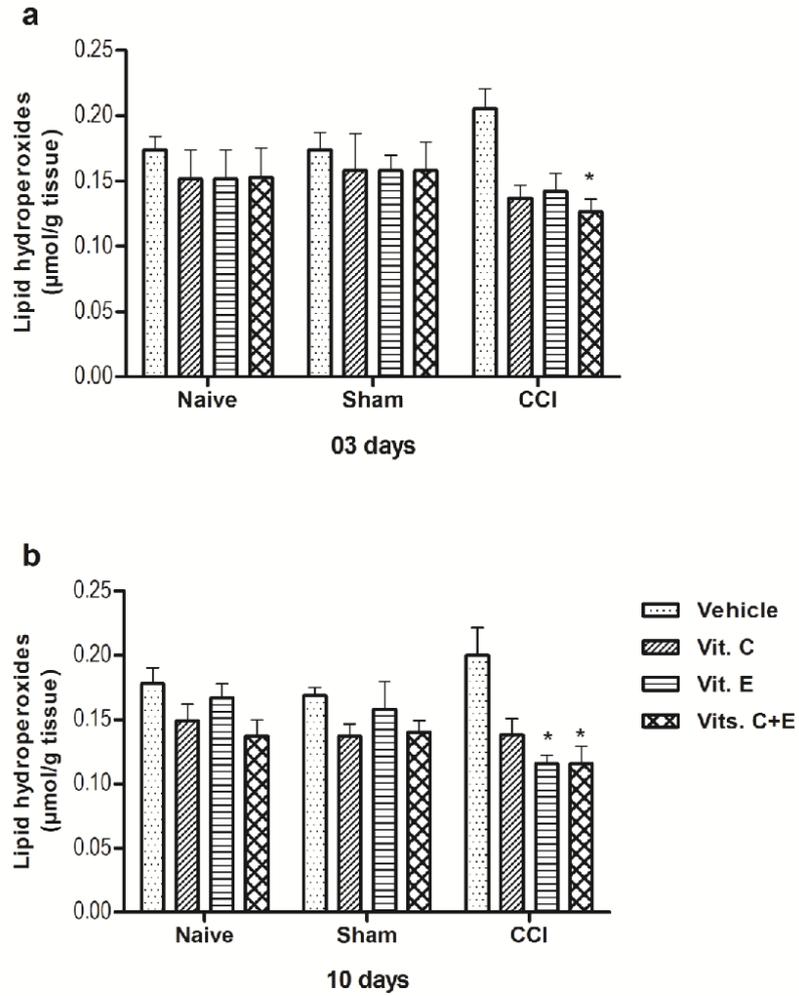
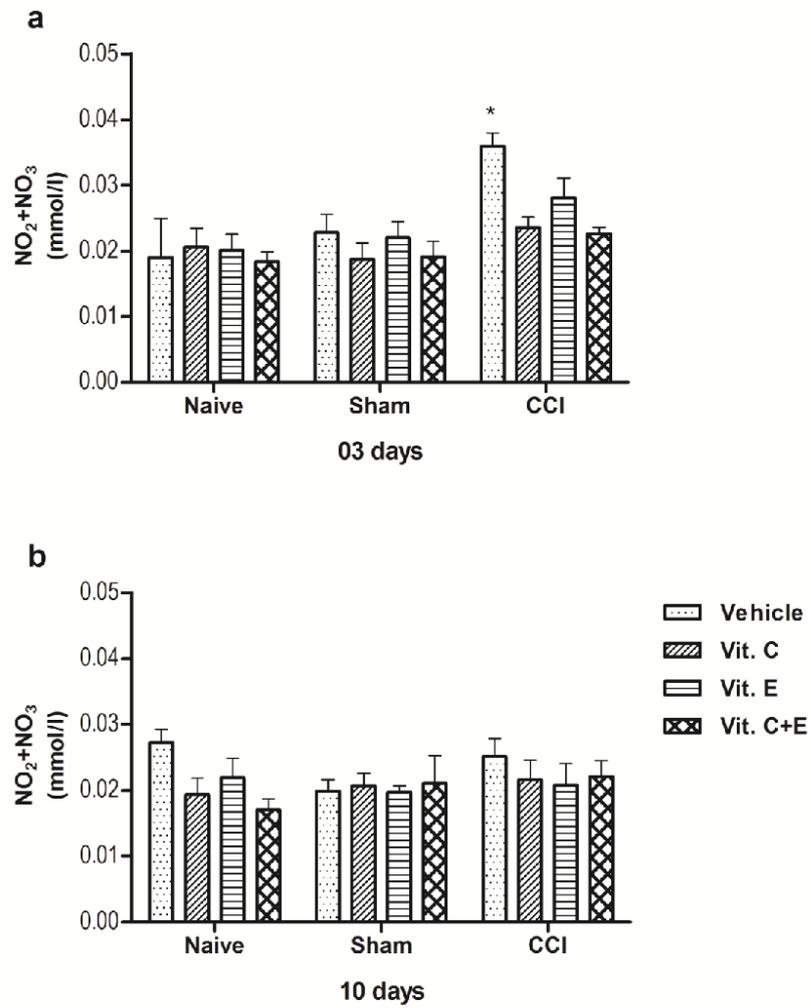


Figure 5



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure 6



### 5.3 ARTIGO 3

Este artigo mostra o efeito da coadministração de vitaminas C e E, sobre as expressões das proteínas p38 fosforilada, Akt e Akt fosforilada, e transportador de vitamina C dependente de sódio do tipo 2 (SVCT-2) em medula espinal lombossacral de ratos com dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica no nervo isquiático. O estudo ainda mostra o efeito do tratamento sobre os valores de ácido ascórbico nesse tecido. Este artigo está submetido a avaliação na revista *Neuroscience letters*.

Elsevier Editorial System(tm) for  
Neuroscience Letters

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Co-administration of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol modifies ascorbic acid content and the expression of p38, Akt and ascorbate transporter SVCT-2 in spinal cord of rats with neuropathic pain

Article Type: Research paper

Keywords: phosphorylate p38; phosphorylate Akt; chronic constriction injury; sciatic nerve

Corresponding Author: Dr. WANIA APARECIDA PARTATA, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Ana Paula K Riffel

Order of Authors: Ana Paula K Riffel; Jéssica A de Souza; Maria do Carmo Q Santos; Adarly Kroth; Elza Maria S da Silveira; Taina Scheid; Andréa Horst; Carolina Kolberg; Maria Flávia M Ribeiro; Luciano S de Fraga; WANIA APARECIDA PARTATA, Ph.D.

Abstract: Co-administration of ascorbic acid (vitamin C) plus L-tocopherol (vitamin E) induces antinociception in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, a model of neuropathic pain. These vitamins modulate the activity of p38 (a member of the family of mitogen-activated protein kinases) and Akt (a protein that regulates key cellular processes) in brain. Since p38 and Akt plays important role in neuropathic pain, this study determined the effect of intraperitoneal administration of vitamins C (30 mg/kg/day)+E (15 mg/kg/day), given for 3 and 10 days, on the expression of phosphorylated-p38 (p-p38), Akt and phosphorylated-Akt (p-Akt) in the lumbosacral spinal cord of rats with CCI. Since p38 appears regulate the SVCT-2 expression, a specific transporter for ascorbic acid, an important antioxidant and neuromodulator in central nervous system, the SVCT-2 expression and ascorbic acid content was also determined. The administrated vitamins prevented the increase in p-p38 and p-Akt expressions and ascorbic acid content, which was found in vehicle-treated CCI rats at 3 and 10 days, while the preventive effect for Akt was found only at day 10. No significant change was found in SVCT-2 expression in CCI rats treated with vitamins C+E, but this expression decreased in vehicle-treated CCI rats for 3 and 10 days. Thus, the co-administration of vitamins C+E interferes in p-p38 and Akt expression and ascorbic acid homeostasis in spinal cord of rats with CC. These changes may be related to the antinociceptive effect of vitamins C+E because p38 and Akt play important roles in proinflammatory conditions.

Suggested Reviewers: Chunfu Wu  
wucf@sypfu.edu.cn

Camila C Portugal  
camila.portugal@ibmc.up.pt

Wen-Tao Liu  
painresearch@njmu.edu.cn

Glenn Wadley  
glenn.wadley@deakin.edu.au

Eugene K Wai  
ewai@ottawahospital.on.ca

Yuguang Huang  
huangyuguanglab@163.com

Mustafa Naziroğlu  
mustafanaziroglu@sdu.edu.tr

Kyung-Hwa Kwak  
kwakkh@knu.ac.kr

## Cover Letter



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

Mail: [fiol@ufrgs.br](mailto:fiol@ufrgs.br) Page: [www.ufrgs.br/fisiologia](http://www.ufrgs.br/fisiologia)  
(051) 33-16-33-20 - Fax: (051) 33-16-31-66  
Rua Sarmiento Leite, 500 - 2° andar  
90050-170 - Porto Alegre - RS - Brasil

Porto Alegre, 11/12/17

Editor-in-Chief  
Neuroscience Letter  
Dr. S. G. Waxman

Dear Editor:

We are submitting for your consideration the manuscript entitled “Co-administration of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol modifies ascorbic acid content and the expression of p-38, Akt and ascorbate transporter SVCT-2 in spinal cord of rats with neuropathic pain” by Ana Paula Konzen Riffel, Jéssica Araújo de Souza, Maria do Carmo Quevedo Santos, Adarly Kroth, Elza Maria Santos da Silveira, Taina Scheid, Andréa Horst, Carolina Kolberg, Maria Flávia Marques Ribeiro, Luciano Stümer de Fraga, Wania Aparecida Partata, for publication in Neuroscience Letters.

I certify that none of the material in this manuscript has been published previously in any form, that none of this material is currently under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Sincerely Yours,

Dr. Wania A. Partata, Ph.D.  
Depto Fisiologia, ICBS, UFRGS  
Rua Sarmiento Leite, 500  
90050-170 Porto Alegre, RS - Brasil

**\*Highlights**

Highlights:

- CCI increased ascorbic acid content, p-p38 and p-Akt, and decreased SVCT-2 expression
- Treatment with vitamins C+E avoid changes in p-p38 and p-Akt expression after CCI.
- Vitamins C+E co-administration prevented the reduction in SVCT-2 expression after CCI

\*Manuscript

[Click here to download Manuscript: Manuscript.docx](#)

[Click here to view linked References](#)

**Co-administration of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol modifies ascorbic acid content and the expression of p38, Akt and ascorbate transporter SVCT-2 in spinal cord of rats with neuropathic pain**

Ana Paula Konzen Riffel<sup>a,\*</sup>, Jéssica Araújo de Souza<sup>a</sup>, Maria do Carmo Quevedo Santos<sup>a</sup>, Adarly Kroth<sup>b</sup>, Elza Maria Santos da Silveira<sup>a</sup>, Taina Scheid<sup>a</sup>, Andréa Horst<sup>c</sup>, Carolina Kolberg<sup>d</sup>, Maria Flávia Marques Ribeiro<sup>a</sup>, Luciano Stümer de Fraga<sup>a</sup>, Wania Aparecida Partata<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup>*Área Ciências da Vida, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, SC, Brazil.*

<sup>c</sup>*Univates, Lajeado, RS, Brazil*

<sup>d</sup>*Faculdade da Serra Gaúcha, Caxias do Sul, RS, Brazil*

\* Corresponding Author. Tel. +55 51 3308 3305; fax: +55 51 3308 3166.

E-mail address: anapkr@gmail.com (A. P. K. Riffel)

**ABSTRACT**

Co-administration of ascorbic acid (vitamin C) plus  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) induces antinociception in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, a model of neuropathic pain. These vitamins modulate the activity of p38 (a member of the family of mitogen-activated protein kinases) and Akt (a protein that regulates key cellular processes) in brain. Since p38 and Akt plays important role in neuropathic pain, this study determined the effect of intraperitoneal administration of vitamins C (30 mg/kg/day)+E (15 mg/kg/day), given for 3 and 10 days, on the expression of phosphorylated-p38 (p-p38), Akt and phosphorylated-Akt (p-Akt) in the lumbosacral spinal cord of rats with CCI. Since p38 appears regulate the SVCT-2 expression, a specific transporter for ascorbic acid, an important antioxidant and neuromodulator in central nervous system, the SVCT-2 expression and ascorbic acid content was also determined. The administrated vitamins prevented the increase in p-p38 and p-Akt expressions and ascorbic acid content, which was found in vehicle-treated CCI rats at 3 and 10 days, while the preventive effect for Akt was found only at day 10. No significant change was found in SVCT-2 expression in CCI rats treated with vitamins C+E, but this expression decreased in vehicle-treated CCI rats for 3 and 10 days. Thus, the co-administration of vitamins C+E interferes in p-p38 and Akt expression and ascorbic acid homeostasis in spinal cord of rats with CC. These changes may be related to the antinociceptive effect of vitamins C+E because p38 and Akt play important roles in proinflammatory conditions.

*Keywords:* Phosphorylate p38, Phosphorylate Akt, Chronic constriction injury; Sciatic nerve

## 1. Introduction

Pharmacological treatments for chronic neuropathic pain are effective in <50% of patients and may be associated with adverse effects that limits their clinical utility [1]. This has impelled a continued search to find novel molecules that have beneficial effects in the management of neuropathic pain.

We recently demonstrated that co-administration of ascorbic acid (vitamin C) and  $\alpha$ -tocopherol (the main vitamin E component) (vitamins C+E), which are potent dietary antioxidants [2], induced antinociception in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve [3], one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain [4]. In cortical neurons, vitamin C or vitamin E modulate the activity of signaling pathways such as p38, a member of the family of mitogen-activated protein kinases (MAPK) [5,6], and Akt, one of key proteins in the PI3K/Akt signaling pathway, which exerts its effects via diverse effectors that regulate key cellular process [7,8]. Both p38 and Akt are phosphorylation-activated enzymes (p-p38 and p-Akt, respectively), which play important roles in neuropathic pain [9,10]. However, changes in expression of p38, Akt and their phosphorylated forms in response to co-administration of vitamins C+E in rats with CCI have not been reported.

In order to shed light on this point, we assessed the effects of intraperitoneal (i.p.) co-administration of vitamins C (30 mg/kg/day)+E (15 mg/kg/day), given for 3 and 10 days, on the expression of p-p38, Akt and p-Akt in the lumbosacral spinal cord of rats with CCI. Since it has been proposed that p38 may regulate the expression of the sodium/vitamin C co-transporter isoform 2 (SVCT-2) [11], a specific transporter for ascorbic acid that appears to be crucial in maintaining ascorbic acid homeostasis in the central nervous system [12], we also assessed the expression of this transporter in the spinal cord of CCI rats treated with vitamins C+E. Furthermore, we also determined the content of ascorbic-acid in the spinal cord of these

rats because ascorbic acid acts as an important antioxidant and neuromodulator of synaptic activity, and functions in the metabolic switch of neurons during conditions of brain activity and rest [12], but the effects of treatment with vitamins C+E on ascorbic-acid content in the spinal cord is still unknown.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals*

All animal procedures were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (#23352). Adult male Wistar rats, weighing 200-250 g, were divided into three experimental groups (naive, sham and CCI). Each group was further subdivided into two subgroups (n=12/subgroup), which received a combination of vitamins C (30 mg/kg/day – L-Ascorbic Acid, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)+E (15 mg/kg/day – DL-alpha-tocopherol acetate, Sigma Chemical Co.) [3] or vehicle, i.p., for 3 or 10 days (n=6/each treatment). The vitamins were freshly prepared in saline containing 1% Tween 80 (Merck) which was used as the vehicle. Administration began on the day of surgery (after recovery from anesthesia) and was performed daily at 17:00 h by the same researcher [3].

### *2.2. Induction of CCI*

CCI was performed based on the procedure described by Bennett and Xie [13], with slight modifications [3]. After anesthesia (90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine), the right common sciatic nerve was exposed proximal to its trifurcation, and four ligatures (4.0 chromic catgut, Shalon Fios Cirúrgicos LTDA, São Luis de Montes Belos, Brazil) were tied

loosely around it. To expose the sciatic nerve in sham rats, all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature.

### 2.3. *Sample preparation*

Rats were killed by decapitation and their lumbosacral spinal cords were promptly dissected out and homogenized in 1.15% KCl diluted 1:5 (w/v) containing 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride. The homogenate was then centrifuged at 1000 x g for 20 min at 4 °C and the supernatant used for assays of ascorbic acid content and protein expression.

### 2.4. *Western blotting*

To identify the expression of proteins, 45 µg of protein was separated on a 10% SDS-PAGE gel and blotted onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 10% nonfat dry milk and incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibody: p-p38 (1:500; Merck Millipore, Billerica, USA), Akt and p-Akt (1:1000 and 1:500, respectively; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), SVCT-2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:2000; Merck Millipore, Billerica, USA). Immunoreactive bands were detected using secondary antibodies and ECL (Merck Millipore), followed by exposing the membrane to autoradiography film (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK).

### 2.5. *Ascorbic acid content*

Ascorbic acid (AA) content was determined according to the method described by Roe and Kuether [14]. The assay mixture contained 0.3 mL homogenate treated with charcoal and filtered, 0.01 mL 10% thiourea and 0.075 mL 2% DNPH, and was incubated at 37 °C for 3 h. Color was then produced by adding 0.375 mL 85% sulfuric acid and the absorbance read at 540 nm. A standard curve was prepared using different concentrations of AA and the slope used to report the amount of AA as  $\mu\text{mol}$  of AA/mg protein.

### 2.6. Statistical analysis

All data are shown as mean $\pm$ SEM of the values of six animals. The results were analyzed using two-way ANOVA (factors: lesion and treatment) followed by Tukey post-hoc test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Statistical analyses were carried out with the software Statistica 7.0.

## 3. Results

After CCI, all rats exhibited a decrease in mechanical threshold (a measure to assess sensitivity to pain), which was prevented by vitamin treatment, as demonstrated in our previous study [3].

After CCI, p-p38 expression increased in the spinal cord of vehicle-treated rats for 3 (81%) and 10 (69%) days, compared to naive rats (Figure 1a,b). No significant change was found in the spinal cord of CCI rats that received vitamins C+E. In these rats, p-p38 expression significantly decreased 39% and 37% at days 3 and 10, respectively, compared to vehicle-treated CCI rats. No significant change was found in p-p38 expression in the spinal cord of naive and sham rats.

The expression of Akt did not change significantly in naive rats. However, after sham surgery, the vehicle-treated rats showed a significant increase (49%) in Akt expression at day 3, compared to naive rats (Figure 2a). This increase was not found in vitamins C+E-treated sham rats for 3 days. During this period of time, Akt expression increased significantly (97%) in vehicle-treated CCI rats compared to the naive group. The increase also occurred in CCI rats treated with vitamins C+E, but the increase was of 85% compared to naive rats. At day 10, Akt expression increased (58%) in vehicle-treated CCI rats compared to the naive group, but CCI rats treated with vitamins C+E exhibited no difference compared to naive group (Figure 2b).

The expression of p-Akt increased only in the spinal cord of the vehicle-treated CCI rats (Figure 3a,b). The increase was 167% and 115% at day 3, and 124% and 115% at day 10, compared to naive and sham rats, respectively. The vitamin treatment prevented the increase in p-Akt expression. At days 3 and 10, no significant change was found in p-Akt expression in the spinal cord of CCI rats treated with vitamins C+E, compared to naive and sham rats. When vehicle-treated CCI rats and CCI rats treated with vitamins C+E were compared, rats that received vitamins C+E showed a decrease of 35% and 38% in p-Akt expression at days 3 and 10, respectively. No significant change was found in p-Akt expression in the spinal cord of naive and sham rats.

After CCI, the vehicle-treated rats showed a significant decrease in SVCT-2 expression at days 3 and 10, with decreases of 50% and 56% at days 3 and 10, respectively, compared to naive and sham rats (Figure 4a,b). In CCI rats treated with vitamins C+E, no significant change was found in SVCT-2 expression at days 3 and 10, compared to naive and sham rats. When vehicle-treated CCI rats and CCI rats treated with vitamins C+E were compared, rats that received vitamins C+E showed an increase of around of 55% and 72% in SVCT-2 expression at days 3 and 10, respectively, compared to vehicle-treated CCI rats; however, this

increase was not significant. The expression of SVCT-2 did not exhibit significant change in naive and sham rats.

Chronic constriction injury induced a significant increase in the ascorbic acid content in the lumbosacral spinal cord of rats that received vehicle treatment. The increase was 119% and 66% at day 3 compared to naive and sham rats, respectively (Figure 5a), but 80% at day 10 (Figure 5b), compared to naive rats. In CCI rats treated with vitamins C+E, the ascorbic acid content significantly increased (90%) in the spinal cord at day 3, but there was no significant change at day 10, compared to naive rats. When CCI rats treated with vitamins C+E and vehicle-treated CCI rats were compared, rats that received vitamins C+E showed ascorbic acid values that were 18% and 26% lower than those found in the vehicle-treated CCI rats for 3 and 10 days, respectively. The ascorbic acid content did not exhibit a significant change in naive and sham rats.

#### **4. Discussion**

The present study showed that the expression of p-p38 and p-Akt increased in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats for 3 and 10 days, while the CCI rats treated with vitamins C+E showed values that were similar to that of naive rats. It has previously been shown that the systemic administration of vitamins C+E reduces phosphorylation of p38 in the spinal cord of rats with spared nerve injury, another model of neuropathic pain. Moreover, this decrease in p38 phosphorylation paralleled the antinociceptive effect of vitamins C+E [15]. We previously demonstrated that the systemic administration of vitamins C+E attenuated neuropathic pain behavior in rats with CCI [3]. Thus, it may be suggested that the decrease in p-p38 expression paralleled antinociception induced by vitamins C+E in rats with CCI. p38 plays an important role in hyperalgesia (increased responsiveness of nociceptive neurons in

the central nervous system to their normal or subthreshold afferent input), which is observed in neuropathic pain [1]. The increase in p-p38 expression in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats may be related to neuropathic pain behavior, as shown in our previous study [3].

Akt plays an important role in CCI-induced neuropathic pain. A recent study showed that the inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway attenuated chronic neuropathic pain [9]. Since our study showed a decrease in p-Akt expression after the administration of vitamins, it is possible that this decrease may also be contributing to the antinociceptive effect of vitamins C+E. Increased p-Akt expression may be related to pain behavior in vehicle-treated CCI rats, as shown in our previous study [3]. However, while the administration of vitamins C+E decreased p-Akt expression at day 3, Akt expression increased at this time point, with values similar to that found in vehicle-treated CCI rats. This result suggests that the effect of vitamins C+E on Akt phosphorylation is faster than their effect on Akt synthesis.

Our study also showed, for first time, that the co-administration of vitamins C+E prevented the reduction in SVCT-2 expression, which was found in vehicle-treated CCI rats for 3 and 10 days. A recent study showed that vitamin C prevented the reduction of SVCT-2 expression in dorsal root ganglia of rats with CCI [16]. According to these authors, vitamin C supplementation may cause a positive feedback in vitamin C uptake by neurons. This effect could be contributing to the SVCT-2 results observed in CCI rats treated with vitamins C+E. However, we cannot rule out the participation of other mechanisms. Vitamins C and E prevent the activation of microglia [17,18]. In neuropathic pain, activation of microglia provides a critical contribution to pathologically enhanced pain processing in the dorsal horn [19]. A recent study showed that depletion of SVCT-2 from the plasma membrane trigger a proinflammatory phenotype in microglia resulting in microglia activation [20]. Thus, it is possible that the maintenance of SVCT-2 expression in the spinal cord of CCI rats treated with vitamins C+E may be contributing to the lower activation of microglia. This effect may

be related to antinociception induced by vitamins [3]. Since proinflammatory stimuli induce SVCT-2 internalization in microglia and microglia activation [20], the reduction in SVCT-2 and consequent activation of microglia may be related to nociception in vehicle-treated CCI rats [3].

Interestingly, while SVCT-2 decreased in the spinal cord, the ascorbic acid content increased in this tissue in vehicle-treated CCI rats. We suggest that this difference may be related to synaptic activity in the spinal cord. CCI induces the release of glutamate [21], and it has been proposed that glutamate released into the synaptic space is taken up by astrocytes, where it stimulates ascorbic acid release from these cells [12]. According to these authors, ascorbic acid sustains the antioxidant requirements of active neurons and their high oxidative metabolism. Thus, increased ascorbic acid content may be indicative of the presence of this mechanism in the spinal cord, since CCI activates glial cells [22]. Since an inflammatory condition triggers SVCT-2 internalization in microglia [20], and reduces SVCT-2 mRNA in neurons and astrocytes [23], the increase in ascorbic acid content could be an attempt to limit the effects of high oxidative metabolism in spite of the decrease in SVCT-2 protein induced by proinflammatory condition. Since vitamins C and E reduce the activation of glial cells [17,18], and have antioxidant actions [2], these functions may be related to the maintenance of SVCT-2 expression and decrease in ascorbic acid content. Nevertheless, the decrease in ascorbic acid content is slow, because this molecule increased at day 3. Since rats treated with vitamins C+E showed an improvement of 102% in the mechanical threshold at day 3, whereas the percentages were 124% and 137% at days 7 and 10, respectively, compared to vehicle-treated CCI rats [3], this difference may be related to glutamate release in the spinal cord. High levels of glutamate in the synaptic space could induce higher astrocytic ascorbic acid recycling and efflux. Supporting this suggestion is the reduction in glutathione levels in the spinal cord (data not shown). The reduction of the oxidized form of ascorbic acid is an

enzymatic reaction, which may depend on glutathione, the most abundant thiol in mammals [12].

Since the changes in SVCT-2 expression paralleled the changes in p-p38 and Akt proteins, we can infer some relationship between these parameters. In fact, recent studies have shown that p38 appears to regulate SVCT-2 expression [11]. However, while the level of SVCT-2 protein was up-regulated by increased p38 expression in the prefrontal cortex [11], our study showed reduction in SVCT-2 protein parallel to an increase in p-p38 expression. At this moment it is not possible to explain this difference, but it may be related to peculiarities of the brain and spinal cord. Differential regulation of oxidative stress responses in the spinal and supraspinal sites in rats with sciatic nerve transection, other model of neuropathic pain, have been demonstrated [24]. However, it has been demonstrated that microglia increases p-p38 expression in neuropathic pain conditions [25]. Thus, the increase in p-p38 may be related to microglia activation in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats. The activation of microglia may be related to changes in SVCT-2, as discussed above. Since vitamins C and E prevent microglia activation [17,18], this effect may be contributing to reduction in p-p38 expression in the spinal cord of CCI rats that received these vitamins. The reduction in microglia activation may be due to changes in SVCT-2.

Microglia activation could also be a link between Akt and SVCT-2. It has been demonstrated that the inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway reduces microglia activation in the spinal cord of CCI rats [9]. Since vitamins C+E reduced p-Akt expression in the spinal cord, we can infer lower activation of microglia and the relation of this activation with SVCT-2 expression. In this context, increased p-Akt expression may be contributing to the activation of microglia. This activation may be due to reduction in SVCT-2 expression in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats, as discussed above.

Some changes were found in sham rats. These changes may be due to the procedures involving manipulation of deep tissues, such as muscles and adjacent connective tissue, which induce pain, as demonstrated elsewhere [24].

Thus, our study showed that the co-administration of vitamins C+E interferes in p-p38, p-Akt and Akt expression and ascorbic acid homeostasis in the spinal cord of rats with CCI. Since p38 and Akt play important roles in neuropathic pain, and ascorbic acid appears as a key factor in physiological and pathological conditions, changes in p38, Akt and SVCT-2 expression and ascorbic acid content may be related to antinociception induced by vitamins C+E in rats with CCI.

#### **Conflict of interest**

All authors declare that they have no conflict of interest.

#### **Author contributions**

A.P.K.R and W.A.P. were responsible for the study concept and design and they prepared and wrote the manuscript. A.P.K.R., J.A.S., M.C.Q.S., A.K., E.M.S.S., T.S., A.H., C.K. performed the experiments. L.S.F and M.F.M.R. helped in the Western blotting procedure and analysis. All authors approved the final manuscript.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

- [1] L. Colloca, T. Ludman, D. Bouhassira, R. Baron, A.H. Dickenson, D. Yarnitsky, R. Freeman, A. Truini, N. Attal, N.B. Finnerup, Neuropathic pain, *Nat Rev Dis Prim.* 3 (2017) 17002. doi:10.1038/nrdp.2017.2.Neuropathic.
- [2] A. Wawrzyniak, M. Górnicka, J. Hamulka, M. Gajewska, M. Drywień, J. Pierzynowska, A. Gronowska-Senger,  $\alpha$ -Tocopherol, ascorbic acid, and  $\beta$ -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress, *Nutr. Res.* 33 (2013) 868–875. doi:10.1016/j.nutres.2013.07.001.
- [3] A.P.K. Riffel, J.A. de Souza, M. do C.Q. Santos, A. Horst, T. Scheid, C. Kolberg, A. Belló-Klein, W.A. Partata, Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats, *Brain Res. Bull.* 121 (2016) 169–177. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.02.004.
- [4] A.S. Jaggi, V. Jain, N. Singh, Animal models of neuropathic pain, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25 (2011) 1–28. doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x.
- [5] Y.N. Huang, C.C. Lai, C.T. Chiu, J.J. Lin, J.Y. Wang, L-ascorbate attenuates the endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation and NF- $\kappa$ B translocation in cortical neurons/glia cocultures, *PLoS One.* 9 (2014) 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0097276.
- [6] E. Giraldo, A. Lloret, T. Fuchsberger, J. Viña, A $\beta$  and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: Protective role of vitamin E, *Redox Biol.* 2 (2014) 873-877. doi: 10.1016/j.redox.2014.03.002.
- [7] I.O. Zakharova, T.V.Sokolova, Y.A. Vlasova, L.V. Bayunova, M.P. Rychkova, N.F. Avrova,  $\alpha$ -Tocopherol at nanomolar concentration protects cortical neurons against oxidative stress, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 216. doi: 10.3390/ijms18010216.

- [8] M. Moretti, J. Budni, C.M. Ribeiro, D.K. Rieger, R.B. Leal, A.L.S. Rodrigues, Subchronic administration of ascorbic acid elicits antidepressant-like effect and modulates cell survival signaling pathways in mice, *J. Nutr. Biochem.* 38 (2016) 50-56. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.09.004.
- [9] J. Guo, H. Wang, X. Jin, D. Jia, X. Zhou, Q. Tao, Effect and mechanism of inhibition of PI3K / Akt / mTOR signal pathway on chronic neuropathic pain and spinal microglia in a rat model of chronic constriction injury, 8 (2017) 52923–52934.
- [10] L. Jiang, C.-L. Pan, C.-Y. Wang, B.-Q. Liu, Y. Han, L. Hu, L. liu, Y. Yangs, J.-W. Qu, W.-T. Liu, Selective suppression of the JNK-MMP2/9 signal pathway by tetramethylpyrazine attenuates neuropathic pain in rats, *J. Neuroinflammation* 14 (2017) 174. doi: 10.1186/s12974-017-0947-x.
- [11] H. Tian, X. Ye, X. Hou, X. Yang, J. Yang, C. Wu, SVCT2, a potential therapeutic target, protects against oxidative stress during ethanol-induced neurotoxicity via JNK/p38 MAPKs, NF- $\kappa$ B and miRNA 125a-5p, *Free Radic. Biol. Med.* 96 (2016) 362-373. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.039.
- [12] A. Covarrubias-Pinto, A.I. Acuña, F.A. Beltrán, L. Torres-Díaz, M.A. Castro, Old things new view: Ascorbic acid protects the brain in neurodegenerative disorders, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 28194–28217. doi:10.3390/ijms161226095.
- [13] G.J. Bennett, Y.K. Xie, A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result, *Pain.* 33 (1988) 87–107. doi:10.1016/0304-3959(88)90209-6.
- [14] J.H. Roe, C.A. Kuether, The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid, *J. Biol. Chem.* 147 (1943) 399–407.
- [15] R. Lu, W. Kallenborn-Gerhardt, G. Geisslinger, A. Schmidtko, Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury, *PLoS*

- One. 6 (2011) 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0029240.
- [16] R. Li, L. Shen, X. Yu, C. Ma, Y. Huang, Vitamin C enhances the analgesic effect of gabapentin on rats with neuropathic pain, *Life Sci.* 15 (2016) 25-31. doi: 10.1016/j.lfs.2016.05.035.
- [17] A. VanHook, Vitamin C prevents microglia activation, *Science* 355 (2017) 1386-1388. doi: 10.1126/science.355.6332.1386-r.
- [18] T. Egger, R. Schuligoi, A. Wintersperger, R. Amann, E. Malle, W. Sattler, Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) attenuates cyclo-oxygenase 2 transcription and synthesis in immortalized murine BV-2 microglia, *Biochem. J.* 370 (2003) 459–467.
- [19] M. Tsuda, T. Masuda, H. Tozaki-Saitoh, K. Inoue, Microglial regulation of neuropathic pain, *J. Pharmacol. Sci.* 121 (2013) 89-94.
- [20] C.C. Portugal, R. Socodato, T. Canedo, C.M. Silva, T. Martins, V.S.M. Coreixas, E.C. Loiola, B. Gess, D. Röhr, A.R. Santiago, P. Young, R.D. Minshall, R. Paes-de-Carvalho, A.F. Ambrósio, J.B. Relvas, Caveolin-1–mediated internalization of the vitamin C transporter SVCT2 in microglia triggers an inflammatory phenotype, *Sci. Signal.* 10 (2017) eaal2005. doi:10.1126/scisignal.aal2005.
- [21] W. Liu, Y. Lv, F. Ren, PI3K/Akt Pathway is Required for Spinal Central Sensitization in Neuropathic Pain, *Cell Mol. Neurobiol.* (2017). doi: 10.1007/s10571-017-0541-x.
- [22] A.M. Jurga, A. Piotrowska, W. Makuch, B. Przewlocka, J. Mika, Blockade of P2X4 receptors inhibits neuropathic pain-related behavior by preventing MMP-9 activation and, consequently, pronociceptive interleukin release in a rat model, *Front Pharmacol* 16 (2017) 8-48. doi: 10.3389/fphar.2017.00048.
- [23] U.V. Berger, X.-C Lu, W. Liu, Z. Tang, B.S. Slusher, M.A. Hediger, Effect of middle cerebral artery occlusion on mRNA expression for the sodium-coupled vitamin C transporter SVCT2 in rat brain. *J. Neurochem.* 86 (2003) 896–906.

- [24] T. Scheid, L.D. Bosco, R.P. Guedes, M.A. Pavanato, A. Belló-Klein, W.A. Partata, Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochem. Res.* 38 (2013) 935-942.
- [25] U.V. Berger, X.-C Lu, W. Liu, Z. Tang, B.S. Slusher, M.A. Hediger, Effect of middle cerebral artery occlusion on mRNA expression for the sodium-coupled vitamin C transporter SVCT2 in rat brain. *J. Neurochem.* 86 (2003) 896–906.

### Figure Legends

**Fig. 1.** p-p38 expression in the lumbosacral spinal cord of rats treated with a combination of vitamin C (30 mg/kg/day) + vitamin E (15 mg/kg/day) (Vitamins C+E) or vehicle (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (**a**) and 10 (**b**) days. Representative western blot bands and a data summary are shown. GAPDH served as loading control. Data are reported as mean $\pm$ SEM. \* indicates a significant difference compared to naive and vitamins-treated CCI rats over the same experimental period ( $P < 0.05$ ; two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test). a.u., arbitrary units.

**Fig. 2.** Akt expression in the lumbosacral spinal cord of rats treated with a combination of vitamin C (30 mg/kg/day) + vitamin E (15 mg/kg/day) (Vitamins C+E) or vehicle (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (**a**) and 10 (**b**) days. Representative western blot bands and a data summary are shown. GAPDH served as loading control. Data are reported as mean $\pm$ SEM. \*\*\* indicates a significant difference compared to naive rats ( $P < 0.05$ ; two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test). a.u., arbitrary units.

**Fig. 3.** p-Akt expression in the lumbosacral spinal cord of rats treated with a combination of vitamin C (30 mg/kg/day) + vitamin E (15 mg/kg/day) (Vitamins C+E) or vehicle (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (**a**) and 10 (**b**) days. Representative western blot bands and a data summary are shown. GAPDH served as loading control. Data are reported as mean $\pm$ SEM. \*\* indicates a significant difference compared to naive and sham rats and vitamins-treated CCI rats over the same experimental period. # indicates a significant difference compared to naive and sham rats ( $P < 0.05$ ; two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test). a.u., arbitrary units.

**Fig. 4.** SVCT-2 expression in the lumbosacral spinal cord of rats treated with a combination of vitamin C (30 mg/kg/day) + vitamin E (15 mg/kg/day) (Vitamins C+E) or vehicle (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (**a**) and 10 (**b**) days.

Representative western blot bands and a data summary are shown. GAPDH served as loading control. Data are reported as mean $\pm$ SEM. # indicates a significant difference compared to naive and sham rats ( $P < 0.05$ ; two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test). a.u., arbitrary units.

**Fig. 5.** Ascorbic acid content in the lumbosacral spinal cord of rats treated with a combination of vitamin C (30 mg/kg/day) + vitamin E (15 mg/kg/day) (Vitamins C+E) or vehicle (saline containing 1% Tween 80) administered intraperitoneally for 3 (**a**) and 10 (**b**) days. Data represent mean  $\pm$  SEM (n= 6/group). \*\*\* indicates a significant difference compared to naive rats. # indicates a significant difference compared to naive and sham rats over the same experimental period ( $P < 0.05$ ; two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test).

Figure1  
[Click here to download high resolution image](#)

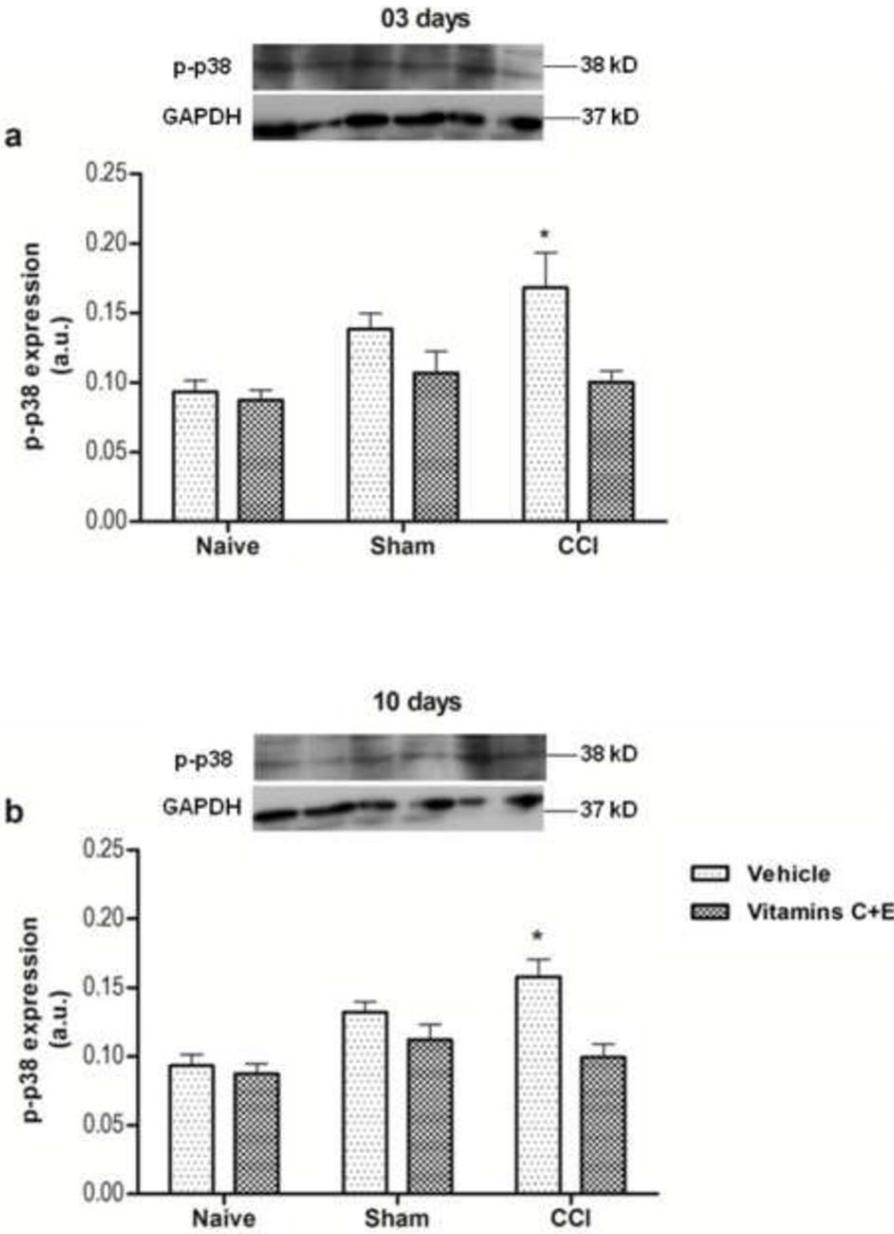


Figure2  
[Click here to download high resolution image](#)

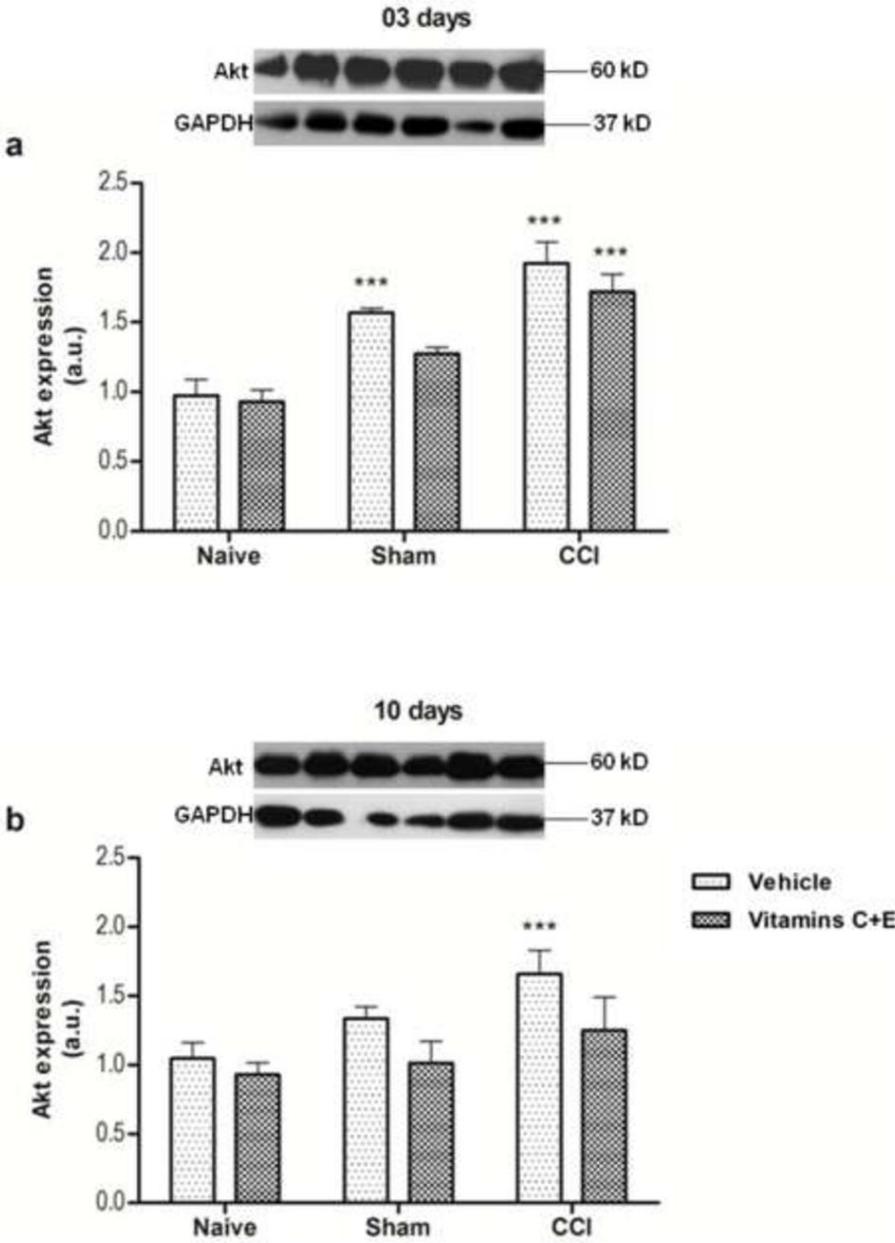


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

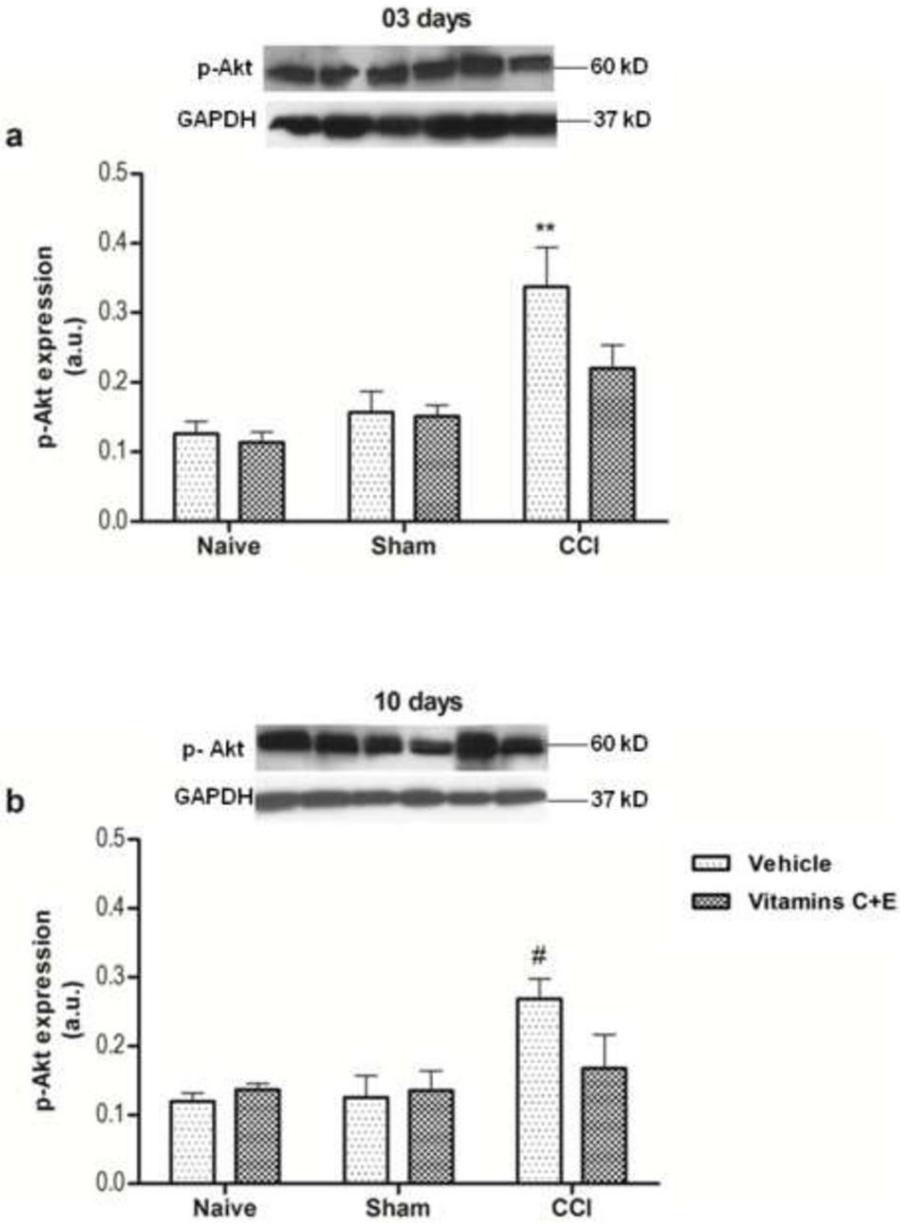


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)

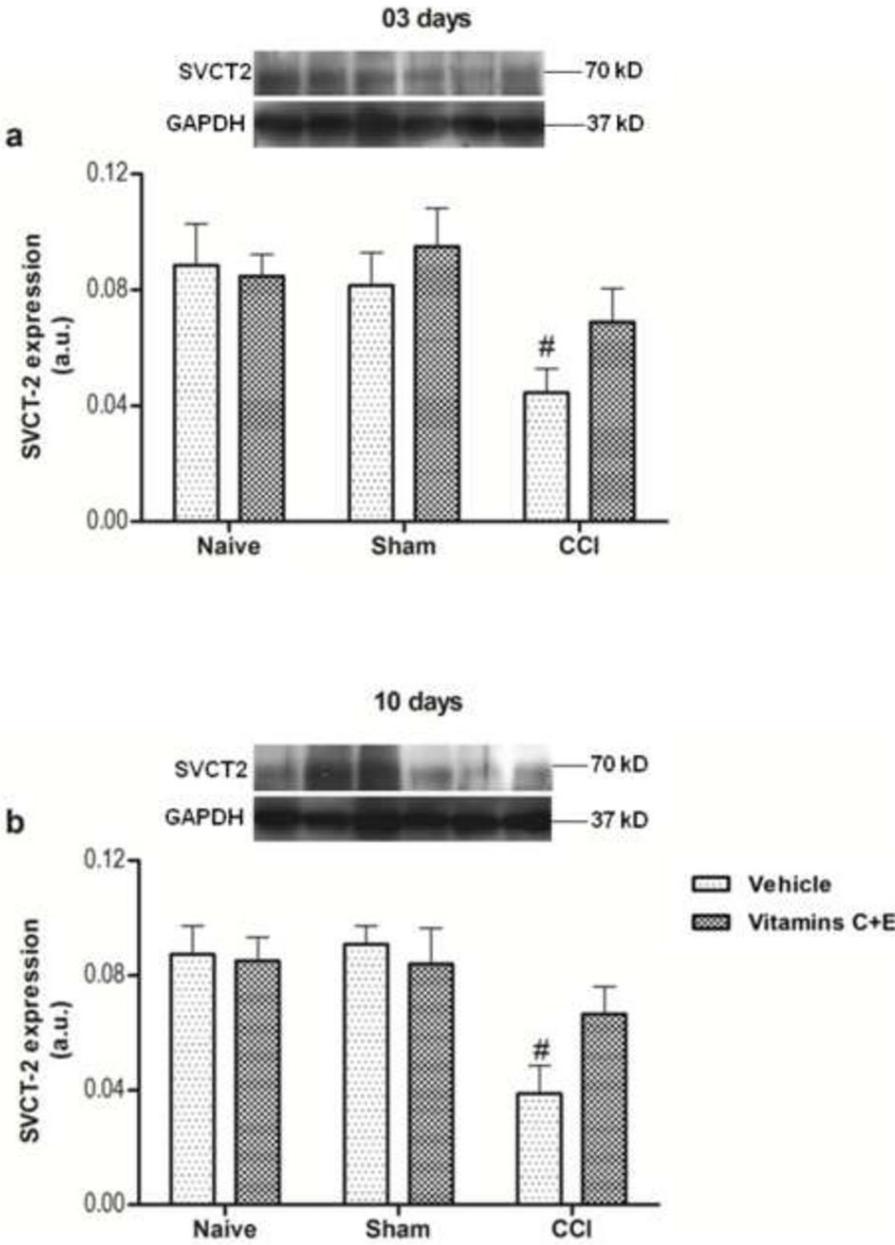
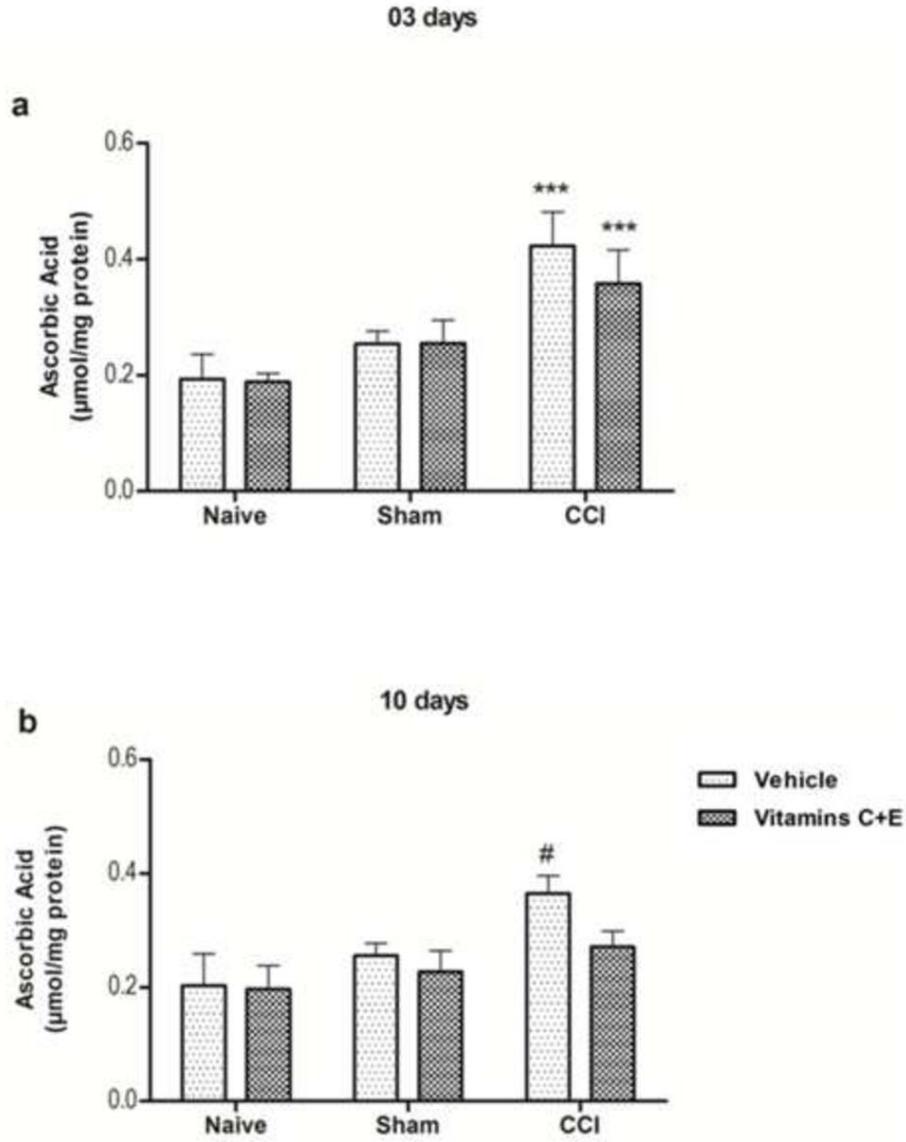


Figure 5  
[Click here to download high resolution image](#)



## 6. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito da vitamina C (ácido ascórbico), na dose de 30 mg/kg/dia, e da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), na dose de 15 mg/kg/dia, administradas i.p. isoladamente ou em conjunto por 3 ou 10 dias, sobre parâmetros nociceptivos, tais como sensibilidade mecânica, sensibilidade térmica e IFI, em animais submetidos a CCI, um modelo de dor neuropática. No estudo também foi observada a duração do efeito antinociceptivo do tratamento após o término das administrações, e o efeito do tratamento quando as vitaminas C+E foram administradas por via oral. Foi ainda avaliado o efeito da administração das vitaminas C+E concomitante à gabapentina, a fim de avaliar se essa combinação era capaz de reduzir a dose deste fármaco. Com o intuito de analisar se a administração das vitaminas poderia induzir toxicidade ou dano no organismo, foi mensurado indicadores de função hepática e renal, como ALT, AST, Gama GT, bilirrubina e creatinina no plasma dos animais tratados, assim como os valores de hidroperóxidos lipídicos, da TAC e da GST no fígado. Foi avaliada ainda a morfologia dos hepatócitos nos animais que receberam administrações de vitaminas. Paralelamente se determinou o efeito da administração das vitaminas sobre os valores de hidroperóxidos lipídicos e da TAC em nervo isquiático lesionado, e formação de  $O_2^{\bullet-}$  e valores de  $H_2O_2$ , metabólitos do NO, hidroperóxidos lipídicos, tióis totais, ácido ascórbico e TAC em segmento lombossacral da medula espinal de ratos com CCI. O estudo também analisou o efeito da administração de vitaminas C+E sobre a expressão de SVCT-2, p-p38, p-Akt e Akt, a fim de inferir a relação entre esses resultados e as alterações nos testes de sensibilidade dolorosa. Um breve resumo dos principais achados no presente estudo é mostrado na Figura 9.

Os ratos são os animais de laboratório mais utilizados em modelos de dor neuropática (KLUSÁKOVÁ; DUBOVÝ, 2009; JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Apesar de sintetizarem seu próprio ácido ascórbico (RICE et al., 2000), os ratos, assim como os humanos, possuem mecanismos de ajuste fino da concentração de ascorbato no plasma (CHEN et al., 2007), e são os animais mais utilizados no estudo do efeito de tratamentos com ácido ascórbico no SNC (ROSA, et al., 2005; LEE; CHOI; 2016; MASON et al., 2016; SAFFARPOUR; NASIRINEZHAD, 2017). Somando-se a isso, os ratos são os animais de laboratório mais frequentemente usados como modelos nos estudos de dor neuropática periférica (JAGGI;

JAIN; SINGH, 2011; GREGORY et al., 2013; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017;). Por todos esses motivos, o presente estudo optou pelo uso de rato como modelo experimental.

Os resultados das avaliações de parâmetros nociceptivos mostraram que os animais submetidos a CCI que receberam solução veículo tiveram redução no limiar mecânico e térmico, o que indica aumento na sensibilidade dolorosa. Esse resultado está de acordo com estudos prévios (GOECKS et al., 2012; HORST et al., 2014; SAFFARPOUR; NASIRINEZHAD, 2017) e demonstra que, de fato, o modelo foi efetivo em promover alterações sensoriais condizentes com as de um quadro de dor neuropática (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; GREGORY et al., 2013). A administração intraperitoneal de vitamina C, vitamina E e vitaminas C+E atenuou as alterações nas sensibilidades mecânica e térmica dos animais CCI, e essa mudança já estava presente aos 3 dias após a lesão nervosa e se manteve nos demais períodos analisados no estudo. O efeito antinociceptivo foi maior nos ratos que receberam administração de vitaminas C+E, e os valores obtidos nos testes de sensibilidade dolorosa foram similares quando essas vitaminas foram administradas i.p. e por via oral. Essa similaridade nos resultados dos testes de sensibilidade dolorosa sugere que o efeito é independente da via de administração. Portanto, pode-se inferir que o uso de vitaminas C+E em indivíduos com dor neuropática poderia se dar por ingestão oral, o que facilita sua aplicabilidade e aceitação pelos humanos. A ausência de alterações significativas nos indicadores plasmáticos de função hepática e renal, e na morfologia dos hepatócitos sugere que o uso das vitaminas não possui efeito tóxico, o que reforça a possibilidade de seu uso clínico.

O efeito antinociceptivo das vitaminas C+E também foi observado em camundongos submetidos à lesão poupadora de nervo (LU et al., 2011) e em ratos com dor neuropática por isquemia/reperfusão em uma articulação de uma das patas posteriores (PARK, et al., 2013). Considerando esses resultados e os do presente estudo se pode sugerir que a administração de vitaminas C+E atenua a dor em diferentes modelos de dor neuropática. De acordo com Lu et al., (2011), o efeito antinociceptivo maior da coadministração das vitaminas C e E, quando comparado ao uso das vitaminas isoladas, pode se relacionar com o efeito sinérgico das vitaminas em combinação. É sabido que a vitamina C regenera a vitamina E, de sua forma radicalar para a forma ativa, o que possibilita que a vitamina E continue suas ações antioxidantes (PARK et al., 2013; FABRE et al., 2015). A administração de vitaminas C+E também possibilita o armazenamento da vitamina E no tecido adiposo, o que pode ocasionar efeito cumulativo desta vitamina e, assim, favorecer o efeito antinociceptivo maior das vitaminas C+E (BUTTERFIELD et al., 2002; KIM et al., 2006; LU et al., 2011).

Contudo, diferente do que foi relatado por Lu et al., (2011), o presente estudo observou efeito antinociceptivo com a administração isolada de vitamina C e vitamina E. O efeito antinociceptivo dessas vitaminas isoladas foi descrito em outros estudos onde foram usados diferentes modelos de dor, como lesão por esmagamento do nervo isquiático (MORANI; BODHANKAR, 2010), neuropatia periférica induzida por ingestão de álcool (TIWARI; KUHAD; CHOPRA, 2009), neuropatia diabética (DAM et al., 1999) e ligadura de raízes espinais (KIM, et al., 2006). É possível que a diferença entre os resultados do presente estudo e aqueles de Lu et al. (2011) se relaciona ao diferente modelo usado para a indução do quadro de dor (CCI e lesão poupadora de nervo, respectivamente). É sabido que modificações sutis no método de indução do quadro de dor neuropática resultam em grandes variações nos resultados dos testes de sensibilidade dolorosa (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Porém, não se pode descartar a possibilidade das diferenças serem resultado do uso de diferentes roedores. Sabe-se que as respostas de cepas endogâmicas e exogâmicas de ratos apresentam diferenças em suas respostas aos testes de sensibilidade dolorosa (YOON et al., 1999).

Ao avaliar o tempo de duração do efeito antinociceptivo da vitamina C, vitamina E e vitaminas C+E após o término dos períodos de administração de 3 e 10 dias, observou-se que o efeito antinociceptivo persistiu nos animais por várias horas, especialmente nos ratos tratados por 10 dias, os quais tiveram duração do efeito por tempo maior. Este efeito antinociceptivo duradouro das vitaminas ainda não havia sido demonstrado. Com base nesse resultado pode-se inferir que o uso das vitaminas C, E e C+E para tratar dor neuropática pode se dar pela administração das vitaminas de maneira alternada, e não necessariamente diária como a usada no presente estudo. Acredita-se que esta forma de tratamento poderia reduzir os efeitos adversos da suplementação por períodos longos de vitaminas C e E, além de possivelmente aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento.

Interessantemente, a duração do efeito antinociceptivo foi maior para a vitamina E do que para a vitamina C. Como a vitamina E é lipossolúvel e desempenha papel importante na proteção das membranas lipídicas (PARK, et al., 2013), o armazenamento desta vitamina no tecido adiposo pode ter contribuído para a duração maior do efeito antinociceptivo. É sabido que as ROS e RNS estão aumentadas em condições de dor neuropática (GUEDES et al., 2006; KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013; GRACE et al., 2016; ZHAO et al., 2017), e que o uso de substâncias com propriedades antioxidantes parece ter um papel importante na atenuação deste tipo de dor (KIM, et al., 2004; GRACE et al., 2016). Como a vitamina C é hidrossolúvel e facilmente excretada na urina (CHEN et al., 2007), o controle fino desta vitamina no organismo possivelmente contribuiu para a duração menor do efeito

antinociceptivo após o término do tratamento. Ainda, como a vitamina C desempenha muitas funções no sistema nervoso, como exemplo atua como antioxidante e neuromodulador (COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015) e exerce papel importante no alívio da dor (KIABI et al., 2013; CARR; MCCALL, 2017;), estas funções devem estar contribuindo para a manutenção do efeito antinociceptivo da vitamina C após a finalização do período de tratamento.

O presente estudo também mostrou, pela primeira vez, que a coadministração de vitaminas C+E concomitante à administração de gabapentina produziu efeito antinociceptivo maior do que o uso apenas de gabapentina em animais com CCI. Esta combinação ainda provocou melhora significativa na função motora dos animais, medida pelo IFI. Esses dados sugerem que poderia ser benéfica a combinação das vitaminas C+E e gabapentina no tratamento de dor neuropática, a qual possui incidência elevada na população mundial, reduz a qualidade de vida dos pacientes acometidos por ela, e ainda possui tratamento limitado na clínica (COLLOCA et al., 2017). Apesar de não estar completamente esclarecido o mecanismo de ação da gabapentina, os estudos sugerem que esse fármaco atua por meio de ligação com a subunidade  $\alpha$ -2 $\delta$  de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (KUKKAR et al., 2013; STOICEA et al., 2015; COLLOCA, 2017) ou pela redução de transportador de aminoácido excitatório do tipo 3 (GIL et al., 2015). Esses efeitos podem ter se somado aos das vitaminas, descritos anteriormente neste texto. O resultado do somatório deve ter contribuído para o efeito antinociceptivo maior com a coadministração das vitaminas C+E concomitante à gabapentina. Assim, o uso das vitaminas C+E concomitante ao tratamento com gabapentina parece constituir uma alternativa para ampliar a analgesia e, ao mesmo tempo, reduzir os efeitos colaterais do tratamento a longo prazo com gabapentina em pacientes com dor neuropática. Um estudo recente destaca a limitação no tratamento desses pacientes e os inúmeros efeitos colaterais dos diferentes fármacos usados no tratamento da dor neuropática (COLLOCA et al., 2017).

Os resultados do IFI mostraram que a CCI no nervo isquiático induziu os sintomas clássicos de danos à caminhada descritos na literatura (SANTOS et al., 2014). O IFI é um método confiável, repetível e quantitativo para avaliar a função motora após lesão no nervo isquiático (KATO et al., 2013). A administração de vitaminas C, E e C+E provocou recuperação nos valores desse índice. É provável que a melhora no IFI tenha relação com a antinocicepção induzida pelo tratamento com as vitaminas. É sugerido que a CCI provoca alterações no padrão de caminhada de ratos devido à dor espontânea ocasionada pela lesão nervosa (NAKAZATO-IMASATO; KUREBAYASHI, 2009). Como a administração das

vitaminas atenuou a sensação dolorosa nos ratos com CCI, pode-se sugerir que a recuperação nos valores do IFI estejam relacionadas com esse efeito das vitaminas.

Inúmeros estudos sugerem que a administração de *scavengers* de ROS ou compostos antioxidantes podem atenuar o comportamento nociceptivo em diversos modelos de dor neuropática (KIM et al., 2012; KIABI et al., 2013; PARK et al., 2013). Além disso, o desenvolvimento da dor neuropática parece relacionar-se com um acréscimo na formação de ROS e RNS, que em excesso podem alterar o estado redox celular e ocasionar prejuízos às funções celulares e vias de sinalização, podendo ainda contribuir para a degeneração neuronal e sensibilização (SALVEMINI et al., 2011; GRACE et al., 2016; GEIS et al., 2017). Porém, essas espécies não possuem apenas efeito deletério. Dependendo da sua concentração, elas também atuam como importantes sinalizadores intracelulares (SALVEMINI et al., 2011; KOMATSU et al., 2017). No presente estudo, paralelo às alterações nas sensibilidades térmica e mecânica e no IFI induzidas pela CCI, observou-se que o tratamento com vitaminas modificou alguns parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo, tanto no local da lesão como em regiões do SNC. Muitas das alterações foram na direção oposta àquelas encontradas nos animais com CCI que receberam apenas veículo. Considerando essas mudanças, a função das vitaminas C e E como antioxidantes, e o papel importante de antioxidantes no tratamento de condições dolorosas, a discussão a seguir relaciona a possível contribuição do efeito antioxidante das vitaminas na antinocicepção induzida pelas vitaminas C, E e C+E.

Os hidroperóxidos lipídicos e a TAC foram avaliados tanto no local da lesão (nervo isquiático lesionado) como no segmento lombossacral da medula espinal. Os resultados mostraram que a lesão nervosa provocou aumento nos valores de hidroperóxidos lipídicos no nervo isquiático e na medula espinal de ratos CCI tratados com veículo. Porém, o acréscimo não foi estatisticamente significativo. A administração das vitaminas, por sua vez, preveniu a mudança nesse parâmetro nos tecidos analisados. O aumento nos valores de hidroperóxidos lipídicos nos animais CCI que receberam veículo pode se relacionar com a maior formação de  $O_2^{\bullet-}$  e de metabólitos do NO nestes animais. Dados da literatura mostram aumento na formação de ROS em condições de dor neuropática periférica, tanto no nervo isquiático (NAIK et al., 2006) como na medula espinal (KIM, et al., 2004; KIM, et al., 2015). Segundo esses autores, a redução nas ROS por meio do uso de antioxidantes pode ser uma alternativa para tratar a dor neuropática. Nesse contexto, pode-se sugerir que as ações antioxidantes das vitaminas C e E estejam atuando sobre as ROS, a exemplo da menor formação de  $O_2^{\bullet-}$  e de metabólitos do NO nos animais que receberam essas vitaminas. Essa redução pode ser a explicação para os valores menores de hidroperóxidos lipídicos no nervo e na medula espinal

de ratos que receberam administrações de vitaminas C e E. Porém, deve se considerar que outros efeitos das vitaminas C e E também podem estar contribuindo para a redução nos valores de hidroperóxidos lipídicos nos tecidos dos animais tratados. Está demonstrado que essas vitaminas regulam canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo T dependentes de voltagem (NELSON et al., 2007), que estão relacionados com formação de ROS (HUANG et al, 2016; GRACE et al., 2016) . Ainda, essas vitaminas reduzem citocinas (OLIVEIRA, et al., 2012). Assim, todas essas ações poderiam também contribuir na antinocicepção induzida pelas vitaminas.

Paralelo às alterações nos valores de hidroperóxidos lipídicos, observou-se um pequeno acréscimo na TAC no nervo isquiático lesionado de ratos CCI que receberam veículo e vitaminas, o que não ocorreu na medula espinal desses ratos. Essa diferença pode estar relacionada às peculiaridades desses tecidos frente a uma condição de dor. Diversos estudos mostram que as alterações patofisiológicas que ocorrem após uma lesão nervosa são mais acentuadas no nervo isquiático. Nesse tecido há uma maior formação de mediadores inflamatórios, liberação de citocinas, formação de ROS e RNS, e aumento na atividade de enzimas antioxidantes (NAIK et al., 2006; MUTHURAMAN; SINGH, 2012; GEIS et al., 2017). Esses autores sugerem que essas mudanças ocorrem com o intuito de conter as mudanças e recuperar o tecido lesionado. Na medula espinal, os mecanismos de controle são mais rígidos quando comparados àqueles da periferia. Apesar de mais permeável quando em situações de dor, a medula espinal apresenta barreira hematencefálica que ainda é capaz de dificultar a passagem de moléculas pró-nociceptivas (SAUER et al., 2017). Isso garante a manutenção de um microambiente homeostático capaz de manter as funções sensoriais e motoras do tecido. É possível que a barreira, juntamente com as alterações intratecduais que visam manter a homeostase, seja a provável causa da falta de variação significativa na TAC na medula espinal.

Apesar da ausência de alterações significativas na TAC na medula espinal, os valores de tióis totais reduziram nos ratos CCI que receberam veículo. A redução foi observada tanto aos 3 como aos 10 dias após o procedimento cirúrgico. Os tióis celulares são um grupo de moléculas que participa diretamente na neutralização de radicais, além de atuar como cofator em vários sistemas enzimáticos (SIES, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O tiol mais abundante nos mamíferos é a GSH, que está diminuída em situações de dor neuropática (NAIK et al., 2006; BHAT et al., 2016). Assim, nosso estudo reproduziu os dados da literatura. Como se postula que a diminuição nos tióis totais se relaciona com a formação das ROS e de RNS (NAIK et al., 2006; BHAT et al., 2016;), pode-se sugerir que a redução observada na medula espinal dos ratos com CCI se deve ao aumento na produção dessas

espécies nos animais CCI. Outro fator que pode contribuir para a queda nos valores de tióis totais é a inibição do trocador cistina-glutamato. Este é um transportador de glutamato que promove o efluxo de glutamato concomitante ao influxo de cistina. A cistina desempenha papel fundamental na síntese e função da GSH. Em condições de dor, o aumento na concentração extracelular de glutamato inibe o trocador cistina-glutamato (ROBERT et al., 2014). Essa inibição pode estar contribuindo para a depleção de GSH e consequente redução nos valores de tióis totais na medula espinal de ratos com CCI que receberam veículo. A falta de alterações significativas na TAC paralelamente a queda nos tióis totais pode se relacionar a aumentos na atividade de outros sistemas antioxidantes. A atividade da CAT aumentou na medula espinal de ratos com CCI (GOECKS et al., 2012). Assim, o complexo quadro de alterações em distintos parâmetros pode ser o responsável pela falta de mudanças significativas na TAC na medula espinal, embora tenha ocorrido queda nos valores de tióis totais nesse tecido.

A administração de vitaminas C, E e C+E preveniu a queda nos valores de tióis totais. Esse efeito possivelmente se relaciona com a atividade antioxidante das vitaminas, a qual foi mencionada anteriormente nesse texto. Para lembrar, a vitamina E desempenha papel protetor importante frente a lesões no sistema nervoso por ser um importante antioxidante lipossolúvel, inibir a produção de radicais livres e regular canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (BÜTÜN et al., 2015). A vitamina C atua diretamente como *scavenger* de ROS e RNS (HARRISON; MAY, 2009) e na regeneração da vitamina E (FABRE et al., 2015). Assim, é possível que as ações antioxidantes destas vitaminas tenham prevenido a depleção nos valores de tióis totais.

Diversos autores sugerem que o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se relaciona com dor de várias etiologias, incluindo a dor neuropática (SALVEMINI et al., 2011; LITTLE; DOYLE; SALVEMINI, 2012; GRACE et al., 2016). No presente estudo houve aumento na formação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em animais com CCI, o qual foi prevenido com a administração de vitaminas. De acordo com a literatura, vitamina C e vitamina E diminuem a formação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e reduzem a ativação de enzimas NADPH oxidases, as quais parecem constituir uma das principais fontes de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (CHEN et al., 2001). Esse efeito possivelmente tem papel importante na diminuição da SAG nos animais tratados com vitaminas C, E e C+E. Como o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  desempenha papel importante na dor, sua redução provavelmente está contribuindo na antinocicepção dos ratos CCI que receberam vitaminas. Nesse contexto, o acréscimo na formação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  na medula espinal dos ratos com CCI tratados com veículo se relaciona com a nocicepção observada nesses animais. Porém, não se pode desconsiderar outros efeitos das vitaminas C e E. A vitamina E regula canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (NAZIROĞLU; ÖZGÜL, 2013), enquanto a vitamina C atua como cofator na

biossíntese de peptídios opióides amidados e metaloenzimas regulatórias (CARR; MCCALL, 2017), todos eventos com papel importante na antinocicepção.

Nos animais tratados com vitamina E e vitamina C+E, a redução na SAG foi observada aos 3 e 10 dias, mas apenas aos 10 dias nos ratos tratados com vitamina C. Esta diferença pode ser atribuída às propriedades pró-oxidantes da vitamina C. É sabido que o ascorbato pode sofrer auto-oxidação dependente do pH, formando  $H_2O_2$  em compartimentos teciduais (CHEN, et al., 2007). Segundo esses autores, esta reação ocorre quando a administração parenteral de vitamina C ultrapassa os limites de controle rígido do ascorbato, o qual é restaurado quando os rins excretam o ascorbato que ultrapassou a capacidade dos transportadores responsáveis pela reabsorção dessa molécula. A ausência de redução nos valores de SAG sugere que o controle rigoroso da concentração de ascorbato estava restaurado aos 10 dias, mas não aos 3 dias nos ratos que receberam vitamina C.

A ausência de alterações no  $H_2O_2$  nos animais com CCI tratados com vitaminas pode estar relacionada aos efeitos das vitaminas como antioxidantes e moduladores de canais de  $Ca^{2+}$ . Nos animais com CCI que receberam apenas veículo, acredita-se que os valores de  $H_2O_2$  foram mantidos pela ação da CAT, que se sabe estar aumentada em medula espinal de ratos com CCI (GOECKS et al., 2012). O  $H_2O_2$  é uma importante molécula neuromoduladora, e seu aumento pode ocasionar inibição na transmissão sináptica e em outras vias de sinalização, o que justifica a necessidade da manutenção de suas concentrações (RICE, 2012).

O tratamento com vitaminas C, E e C+E preveniu o aumento dos metabólitos do NO, os quais estavam aumentados na medula espinal dos ratos com CCI tratados com veículo por 3 dias. Esta ação das vitaminas pode se relacionar com os efeitos modulatórios das mesmas em canais de  $Ca^{2+}$ , como já mencionado. Sabe-se que a formação de NO, molécula com papel importante no processamento nociceptivo (ZHOU et al., 2015), é induzida por ativação de NOS, que é dependente de cálcio/calmodulina e ocorre devido à estimulação dos receptores NMDA (GRACE et al., 2016). A vitamina E modula a ativação de canais iônicos de receptor de potencial transitório relacionado à melastatina do tipo 2 (TRPM2), que são redox sensíveis (NAZIROĞLU; ÖZGÜL, 2013). A vitamina C inibe a isoforma  $C_{av}3.2$  de canais de  $Ca^{2+}$  tipo T, que estão envolvidos na dor neuropática (NELSON et al., 2007). Essas ações podem ter contribuído para o efeito das vitaminas sobre os metabólitos do NO. Nos animais com CCI que receberam apenas veículo, o aumento dos metabólitos do NO possivelmente tenha relação com a queda nos valores de tióis totais encontrada nesses animais. A glutathiona é um tiol com papel importante na disponibilidade de NO. O aumento no NO pode levar a formação de S-nitrosotióis, os quais preservam a bioatividade e aumentam o tempo de meia-vida do NO

(ROBACZEWSKA et al., 2016). Esta reação possivelmente contribuiu para o aumento dos metabólitos do NO nos animais com CCI que receberam apenas veículo, e também para a redução do conteúdo de tióis totais neste grupo.

O aumento dos valores de ácido ascórbico nos animais CCI tratados com veículo pode ser decorrente das funções essenciais do ascorbato no SNC. Nesse tecido, o ascorbato atua como uma importante molécula antioxidante, como um neuromodulador de atividade sináptica, e na troca metabólica dos neurônios durante condições de atividade e repouso, conforme mecanismo descrito por Covarrubias-Pinto et al. (2015) e explicado a seguir:

Em encéfalo, uma lesão nervosa provoca aumento na liberação de glutamato. Essa molécula atua em diferentes tipos celulares presentes no tecido nervoso, incluindo os astrócitos. Nessa célula, o glutamato estimula a liberação de ascorbato. O ascorbato liberado entra no neurônio devido a presença na membrana plasmática dessa célula do transportador SVCT-2. Dentro do neurônio, o ascorbato sustenta as necessidades antioxidantes e, nesse processo, é oxidado a dehidroascorbato. O dehidroascorbato sinaliza ao neurônio a necessidade de ativar a via das pentoses e se dirige ao espaço extracelular passando por transportadores de glicose do tipo GLUT 3. O dehidroascorbato entra no astrócito passando por GLUT 1 e, nessa célula, é transformado em ascorbato, processo esse que depende, em parte, de GSH (Figura 4).

Esse mecanismo ainda não foi descrito em medula espinal. Porém, parece plausível sugerir que o mesmo também ocorra nesse tecido. Com base nessa proposição, pode-se inferir que o aumento nos valores de ácido ascórbico se deve a esse mecanismo de sinalização entre neurônio e astrócito na medula espinal de ratos com CCI. É sabido que a dor neuropática induzida por CCI ocasiona ativação de células da glia na medula espinal (JURGA et al., 2017). Como as vitaminas C e E reduzem a ativação de células gliais (EGGER et al., 2003; VANHOOK, 2017) e possuem ações antioxidantes, a administração dessas vitaminas pode ter ocasionado menor ativação do sistema de sinalização do ascorbato na comunicação neurônio-astrócito. Ainda, como os animais que receberam administrações de vitaminas C, E e C+E apresentaram melhora na sensibilidade mecânica nos períodos analisados, sugere-se que esta melhora tenha provocado redução no glutamato extracelular, o que levaria a um fluxo menor de ascorbato entre neurônios e células da glia. O aumento nos tióis totais nos animais com CCI tratados com vitaminas pode ser também um indicativo de menor consumo de GSH na reciclagem de dehidroascorbato.

O presente estudo também mostrou, pela primeira vez, que a coadministração de vitaminas C+E previne a redução na expressão de SVCT-2, a qual foi observada em animais

com CCI tratados com veículo. Acredita-se que este resultado tenha relação com a ativação de células gliais. De acordo com Portugal et al., (2017), a redução na expressão de SVCT-2 promove um fenótipo pró-inflamatório na microglia e leva a sua ativação. Em condições de dor neuropática, observa-se ativação da microglia (WANG et al., 2017), a qual parece ser essencial para o processamento nociceptivo patológico da dor neuropática (POPIOLEK-BARCZYK; MIKA, 2016). Considerando os resultados do presente estudo, é possível que a redução na expressão de SVCT-2 tenha relação com a ativação da microglia em medula espinal de animais com CCI que receberam apenas veículo. É sabido que a CCI provoca ativação das células da microglia (XU et al., 2016; POPIOLEK-BARCZYK; MIKA, 2016; WANG et al., 2017), e quando há internalização dos transportadores SVCT-2, há ativação da microglia (PORTUGAL et al., 2017). A internalização desse transportador pode ter contribuído para a redução na expressão de SVCT-2 na medula espinal de ratos com CCI. É sabido que diferentes estímulos regulam a expressão do gene do SVCT-2 (SØGAARD et al., 2014; LI et al., 2016; ZAREBKOHAN et al., 2016). Contudo, a situação pode ser diferente quando se administra vitaminas C+E. De acordo com dados da literatura, as vitaminas C e E previnem a ativação da microglia (EGGER et al., 2003; VANHOOK, 2017). Essa prevenção possivelmente se relaciona com a manutenção da expressão de SVCT-2 na medula espinal dos ratos CCI tratados com vitaminas C+E. Contudo, essa sugestão não exclui a participação de outros mecanismos na manutenção da expressão de SVCT-2 em medula espinal de ratos CCI que receberam administrações de vitaminas C+E. Um estudo recente mostrou que a vitamina C previne a redução na expressão de SVCT-2 no gânglio da raiz dorsal de ratos com CCI (LI et al., 2016). Estes autores sugerem que a suplementação com vitamina C determina um *feedback* positivo na entrada de vitamina C em neurônios. Essa maior entrada de vitamina C possivelmente também contribuiu para a manutenção da expressão de SVCT-2 no tecido nervoso de ratos com CCI.

É interessante que a expressão de SVCT-2 reduziu, enquanto os valores de ácido ascórbico aumentaram na medula espinal de ratos CCI que receberam veículo. Embora seja cedo para especulações devido à limitação de resultados experimentais abordando esse tema em condições de dor, pode-se sugerir que o aumento do ácido ascórbico indica uma maior comunicação entre neurônio e astrócito. Isso possivelmente se deve ao aumento nas ROS e RNS induzida pela dor (SALVEMINI et al., 2011; GEIS et al., 2016). A redução da expressão de SVCT-2 limita, mas não impede a interação entre neurônio e células da glia. Provavelmente o fluxo maior de ascorbato seja uma consequência da redução no transportador SVCT-2. Um apoio a essa sugestão é a redução nos valores de tióis totais na

medula espinal de ratos CCI que receberam veículo, e estudos que mostram aumento na expressão de GLUTs, responsáveis também pelo transporte de dehidroascorbato, em tecido nervoso lesionado (LI et al., 2016).

As ROS e RNS, também atuam como moléculas sinalizadoras, as quais modulam vias de sinalização como a da p38 e a da PIK3/Akt. Um estudo recente mostrou que a ativação por ROS de p38 e Akt induz ativação de NF- $\kappa$ B (KOMATSU et al., 2017). Segundo esses autores, o fator NF- $\kappa$ B desencadeia a síntese de citocinas e inúmeros mediadores proinflamatórios que contribuem para a sensação dolorosa.

A p38 é uma molécula envolvida no desenvolvimento da dor neuropática, cuja ativação contribui para a hiperalgesia (JI, SUTER, 2007; COLLOCA et al., 2017). Os dados da literatura indicam que o aumento na produção de ROS estimula a fosforilação da p38 (KOMATSU et al., 2017). Assim, o aumento na expressão da p-p38 nos animais CCI que receberam veículo pode se relacionar às alterações de parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo encontradas no presente estudo. Essa mudança possivelmente tenha também relação com a nocicepção, já que a p38 possui papel importante na nocicepção (XU et al., 2007; QU et al., 2016). A administração de vitaminas, por sua vez, reduziu a expressão de p-p38 na medula espinal. É possível que as ações antioxidantes das vitaminas C+E reduziram as ROS, e essa redução contribuiu para evitar o aumento na expressão da p-p38 em medula espinal de ratos com CCI. A diminuição da p-p38, por sua vez, provavelmente favoreceu o efeito antinociceptivo das vitaminas C+E. Um apoio a essa hipótese é que a redução da p-p38 se deu paralelamente a antinocicepção. É sabido que a administração de inibidor de p38 provoca redução na hiperalgesia após lesão nervosa em ratos (XU et al., 2007).

Apesar de estudos realizados em córtex pré-frontal indicarem que o aumento na expressão da p-p38 induz acréscimo na expressão de SVCT-2 (TIAN et al., 2016), o presente estudo encontrou diminuição na expressão desse transportador com o aumento na expressão de p-p38. No momento não é possível explicar essa diferença, mas acredita-se que a mesma seja decorrente das peculiaridades do córtex cerebral e da medula espinal. Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram alterações distintas em respostas oxidativas na medula espinal e encéfalo em modelo de transecção do nervo isquiático (SCHEID et al., 2013). Contudo, sabe-se que a ativação da microglia aumenta a expressão da p38 em condições de dor neuropática (BERTA et al., 2016). Acredita-se que no presente estudo, embora não tenha sido demonstrado experimentalmente, também houve ativação da microglia na medula espinal de ratos com CCI tratados com veículo. A prevenção da ativação da microglia pelas vitaminas C e E, como já mencionado anteriormente (EGGER et al., 2003; VANHOOK, 2017), pode

ocorrer devido a manutenção da expressão de SVCT-2 nos animais com CCI que receberam vitaminas C+E.

A expressão da p-Akt também foi diminuída com a coadministração de vitaminas C+E após CCI. Um estudo recente mostrou que a inibição da via PI3K/Akt/mTOR contribui para a atenuação da dor neuropática (GUO et al., 2017). Assim, é possível que a redução na expressão da p-Akt pela administração das vitaminas C+E contribuiu para o efeito antinociceptivo dessas vitaminas. Segundo dados da literatura, a ativação de PI3K/Akt pode levar a aumento nas ROS, especialmente o  $O_2^{\bullet-}$  (ZHAO et al., 2017). O  $O_2^{\bullet-}$  parece ativar a Akt (LI et al., 2013). Como o presente estudo mostrou que o tratamento com vitaminas C+E diminuiu a SAG, sugere-se que esta ação tenha contribuído para a redução na expressão da p-Akt nos animais CCI tratados com vitaminas C+E. Como a expressão da Akt não foi alterada com o tratamento com vitaminas C+E, esse resultado indica que essas vitaminas atuam mais rapidamente sobre a fosforilação do que sobre a síntese de Akt.

A ativação da microglia também pode estar relacionada com a Akt e o SVCT-2. Dados da literatura indicam que a inibição da sinalização PI3K/Akt/mTOR reduz a ativação da microglia em medula espinal de ratos com CCI (GUO, et al., 2017). Como o tratamento com vitaminas C+E reduziu a expressão de p-Akt, pode-se inferir uma menor ativação microglial na medula espinal desses ratos. Essa ativação menor das células microgliais poderia estar relacionada à manutenção da expressão de SVCT-2, como discutido anteriormente. Dessa forma, o aumento na expressão de p-Akt pode contribuir para a ativação da microglia, e essa ativação pode se relacionar com a redução na expressão de SVCT-2 nos animais com CCI que receberam apenas veículo. Neste contexto, o aumento do conteúdo de ácido ascórbico nestes animais pode ser uma tentativa de limitar os efeitos do alto metabolismo oxidativo, apesar da redução na expressão de SVCT-2, como proposto anteriormente.

Cabe mencionar ainda que algumas modificações foram encontradas em animais do grupo sham. Essas alterações podem ser decorrentes dos procedimentos envolvendo a manipulação de tecidos profundos, como músculos e tecido conjuntivo adjacente, que induz dor (SCHEID et al., 2013). Segundo esses autores, a manipulação sham deve induzir uma sensibilização muito menor na medula espinal, o que deve induzir alterações distintas em parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo em medula espinal. Essa diferença provavelmente foi a responsável pelas alterações distintas nos grupos sham e CCI encontradas no presente estudo.

Assim, os resultados do presente estudo (para revisão, ver Figura 9) reforçam a ação antinociceptiva das vitaminas C, E e C+E em condição de dor neuropática, e mostram que o

efeito é maior quando se administra vitaminas C+E. O estudo também mostra que o efeito antinociceptivo ocorre quando as vitaminas são administradas i.p. e por via oral, que este efeito dura por várias horas após o término das administrações diárias por 3 e 10 dias, e que o efeito de atenuação da nocicepção do fármaco gabapentina é maior quando se faz administração do mesmo concomitante a das vitaminas C+E. Paralelamente, a administração das vitaminas C, E e C+E muda parâmetros oxidativos no nervo isquiático lesionado, e parâmetros oxidativos e nitrosativo, e de sinalização intracelular no segmento lombossacral da medula espinal, sendo muitas das alterações em direção oposta àsquelas induzidas pela CCI. Interessantemente, as administrações das vitaminas não parecem induzir toxicidade ao organismo, pelo menos frente aos parâmetros analisados no estudo. Assim, a administração das vitaminas C, E e C+E poderia ser uma alternativa como coadjuvante a medicações clássicas usadas no tratamento de condições de dor neuropática. Porém, é necessário cautela na extrapolação dos resultados para os humanos. Ratos e humanos exibem diferenças nas respostas a dor, e isto torna necessária a realização de estudos complementares em humanos.

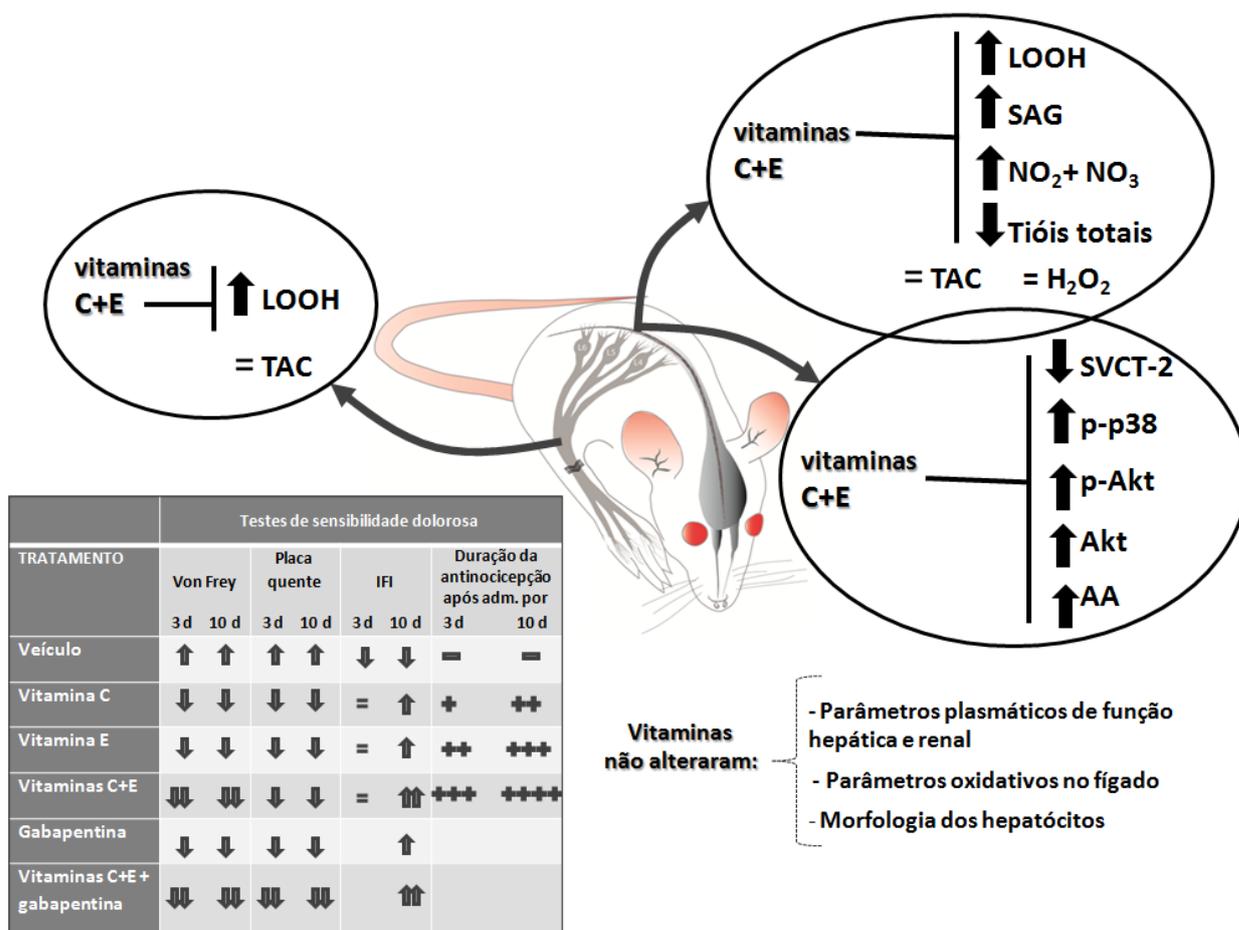


Figura 9: Esquema mostrando breve resumo dos principais resultados do presente trabalho quando se administrou vitaminas C+E em ratos com dor neuropática por lesão por constrição crônica no nervo isquiático (linhas transversais de cor preta no nervo representado na cor cinza). Foram omitidos os dados dos efeitos das administrações de vitaminas C e E por ser esses muito similares aos das vitaminas C+E. Para descrição das abreviaturas, consulte a lista de abreviaturas na página 15 dessa tese (Elaborado pela autora).

---

## 7. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que o tratamento com vitamina C, vitamina E e vitaminas C+E atenuou a nocicepção em ratos com CCI, um modelo de dor neuropática, e o efeito foi maior quando as vitaminas foram administradas conjuntamente. A administração das vitaminas concomitante com gabapentina, um fármaco usado no tratamento de dor neuropática, provocou maior efeito antinociceptivo nos ratos com CCI do que quando se usou apenas gabapentina. Ainda, pela primeira vez se observou que o efeito antinociceptivo das vitaminas C, E e C+E dura por várias horas após o término do período de administração de 3 e 10 dias, e melhora o IFI, uma medida de recuperação pós-lesão nervosa.

Paralelamente, observou-se que a administração das vitaminas C, E e C+E modifica parâmetros oxidativos em nervo isquiático lesionado, e parâmetros oxidativos e nitrosativos em segmento lombossacral da medula espinal, a região de entrada das informações aferentes do nervo isquiático. No nervo isquiático, as vitaminas preveniram acréscimo nos valores de hidroperóxidos lipídicos e aumentaram a TAC. Na medula espinal, as vitaminas reduziram a formação de  $O_2^{\bullet-}$ , os metabólitos do NO e os hidroperóxidos lipídicos, além de prevenirem a redução nos valores de tióis totais, aos 3 e 10 dias, e o acréscimo no ácido ascórbico aos 10 dias, sem induzir qualquer alteração nos valores de  $H_2O_2$  e TAC. A administração conjunta de vitaminas C+E ainda preveniu, na medula espinal, o aumento na expressão das proteínas p-p38 e p-Akt e a redução na expressão do transportador SVCT-2, sem modificar a expressão da Akt aos 3 dias após a CCI.

Como a redução de ROS e RNS parece constituir alternativa no tratamento da dor neuropática, e as vitaminas C e E já foram usadas, separadamente, para tratar humanos em condição de dor, os resultados do presente estudo reforçam o uso das vitaminas C, E e C+E para tratar condição de dor neuropática. Os resultados também ampliam o conhecimento sobre os efeitos do tratamento com essas vitaminas sobre o tecido nervoso, tema que ainda possui muitas questões em aberto. O estudo ainda sugere que o uso das vitaminas não parece induzir toxicidade ao organismo e poderia ser uma alternativa como coadjuvante a medicações clássicas usadas no tratamento de condições de dor neuropática. Porém, é necessária a realização de estudos complementares em humanos, dada às diferenças nas respostas à dor em ratos e humanos.

---

## 8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, propõe-se avaliar moléculas de sinalização, como exemplo a expressão do NF- $\kappa$ B e de citocinas como o TNF- $\alpha$  e a IL-10 em medula espinal lombossacral de ratos com CCI tratados com vitaminas C, E e C+E. Propõe-se também avaliar nesse tecido vias de apoptose/sobrevivência celular, mediante determinação das expressões das proteínas Bax e BCl-2. Sugere-se ainda avaliar a expressão de proteínas relacionadas à sinalização glutamatérgica, como as subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA e os transportadores de aminoácido excitatório tipos 1 e 2 (EAAT1 e EAAT2, respectivamente).

Dada a fundamental importância da ativação de células da glia no contexto desse trabalho, propõe-se ainda determinar os efeitos do tratamento com vitaminas C, E e C+E sobre o padrão de imunorreatividade e a expressão de marcadores de células da glia, como GFAP (marcador de astrócitos) e OX42 e IBA 1 (marcador de microglia).

Sugere-se também avaliar, mediante uso de técnicas histológicas, a recuperação do nervo isquiático e o padrão de distribuição da atividade da enzima NADPH-diaforase, que é uma NOS, em medula espinal de ratos com CCI tratados com vitaminas C, E e C+E.

Como se sabe que os efeitos da dor neuropática se estendem a regiões mais superiores do neuroeixo, propõe-se avaliar parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo em córtex e tronco encefálico de ratos com CCI tratados com vitaminas C, E e C+E.

---

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L.; FRANCO, M. C.; ESTEVEZ, A. G. Reactive nitrogen species in cellular signaling. **Experimental Biology and Medicine**, 2015. v. 240, n. 6, p. 711–717. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370215581314>>.

ANDREOLLO, N.A.; SANTOS, E.F. ARAUJO, M.R.; LOPES, L.R.; Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, 2012. v.25, p.49-51.

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

ALLEN, R. .; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, fev. 2000. v. 28, n. 3, p. 463–499. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584999002427>>.

ALMEIDA, A. *et al.* Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 18 dez. 2001. v. 98, n. 26, p. 15294–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742096>>.

AL-REJAIE, S. *et al.* Gender difference following high cholesterol diet induced renal injury and the protective role of rutin and ascorbic acid combination in Wistar albino rats. **Lipids in Health and Disease**, 2012. v. 11, n. 1, p. 41. Disponível em: <<http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-11-41>>.

AZZI, A. *et al.* The rise, the fall and the renaissance of Vitamin E. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2016. v. 595, p. 100–108.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, 2010. v. 9, n. 8, p. 807–819. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70143-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70143-5)>.

BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, 2009. v. 139, n. 2, p. 267–284.

BECKHAUSER, T. F.; FRANCIS-OLIVEIRA, J.; PASQUALE, R. DE. Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity. **Journal of Experimental Neuroscience**, 2016. v. 2016, p. 23–48.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. **Pain**, 1988. v. 33, p. 87–107. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6)>.

BERTA, T. *et al.* Microglial Signaling in Chronic Pain with a Special Focus on Caspase 6, p38 MAP Kinase, and Sex Dependence. **Journal of Dental Research**, 20 set. 2016. v. 95, n.

10, p. 1124–1131. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034516653604>>.

BETTI, M. *et al.* Dietary supplementation with  $\alpha$ -tocopherol reduces neuroinflammation and neuronal degeneration in the rat brain after kainic acid-induced status epilepticus. **Free Radical Research**, 13 out. 2011. v. 45, n. 10, p. 1136–1142. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2011.597750>>.

BHAT, R. A. *et al.* Effect of ursolic acid in attenuating chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, dez. 2016. v. 30, n. 6, p. 517–528. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/fcp.12223>>.

BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254, 1976.

BUTTERFIELD, D. A. *et al.* Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2002. v. 13, n. 8, p. 444–461.

BUTTERFIELD, D. A. *et al.* Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. **Nutritional Neuroscience**, 2002. v. 5, n. 4, p. 229–239.

BÜTÜN, A. *et al.* Riboflavin and Vitamin E Increase Brain Calcium and Antioxidants, and Mitochondrial Calcium-ATP-ase Values in Rat Headache Models Induced by Glyceryl Trinitrate. **The Journal of Membrane Biology**, 26 abr. 2015. v. 248, n. 2, p. 205–213. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00232-014-9758-5>>.

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

BYUN, S.H.; JEON, Y.; Administration of vitamin C in a patient with herpes zoster - A case report. **Korean Journal of Pain**, 2011. v. 24, p.108-111.

CARR, A. C.; MCCALL, C. The role of vitamin C in the treatment of pain: new insights. **Journal of Translational Medicine**, 2017. v. 15, n. 1, p. 77. Disponível em: <<http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-017-1179-7>>.

CHEN, J.-Y. *et al.* Plasma Vitamin C Is Lower in Postherpetic Neuralgia Patients and Administration of Vitamin C Reduces Spontaneous Pain but Not Brush-evoked Pain. **The Clinical Journal of Pain**, set. 2009. v. 25, n. 7, p. 562–569. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002508-200909000-00002>>.

CHEN, Q. *et al.* Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 22 maio. 2007. v. 104, n. 21, p. 8749–8754. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702854104>>.

CHEN, X. *et al.* Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, set. 2001. v. 38, n. 3 Pt 2, p. 606–11. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566940>>.

CHEN, Z. *et al.* NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamatergic

pathway during nociceptive processing. **Pain**, 2010. v. 149, n. 1, p. 100–106. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2010.01.015>>.

CHOI, Y.-B.; LIPTON, A. Redox modulation of the NMDA receptor. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci**, 2000. v. 57, p. 1535–1541.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **Bmj**, 2014. v. 348, n. feb05 6, p. f7656–f7656. Disponível em: <<http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.f7656>>.

COLLOCA, L. *et al.* Neuropathic pain. **Nat Rev Dis Primers**, 2017. v. 3, n. Imi, p. 17002.

COVARRUBIAS-PINTO, A. *et al.* Old things new view: Ascorbic acid protects the brain in neurodegenerative disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, 2015. v. 16, n. 12, p. 28194–28217.

D’MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, 2008. v. 101, n. 1, p. 8–16.

DE MEDINACELI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental neurology**, 1982. v. 77, p.634-643.

DAM, P. S. VAN *et al.* High rat food vitamin E content improves nerve function in streptozotocin-diabetic rats. **European journal of pharmacology**, 9 jul. 1999. v. 376, n. 3, p. 217–22. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448879>>.

DAS, V. **An introduction to pain pathways and pain “targets”**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2015. V. 131.

DELLAROZA, M. S. G. *et al.* Dor crônica em idosos residentes em São Paulo, Brasil: prevalência, características e associação com capacidade funcional e mobilidade (Estudo SABE). **Cadernos de Saúde Pública**, fev. 2013. v. 29, n. 2, p. 325–334. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2013000200019&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2013000200019&lng=pt&tlng=pt)>.

DEPINTOR, J. D. P. *et al.* Prevalence of chronic spinal pain and identification of associated factors in a sample of the population of São Paulo, Brazil: cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, out. 2016. v. 134, n. 5, p. 375–384. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-31802016000500375&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802016000500375&lng=en&tlng=en)>.

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

DIONNE, C. E. *et al.* Serum vitamin C and spinal pain. **PAIN**, nov. 2016. v. 157, n. 11, p. 2527–2535. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006396-201611000-00018>>.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Review**, 2002. v. 82, p. 47–95.

DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, dez. 2012. v. 1826, n. 2, p. 443–457. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X12000509>>.

DUBNER, R. Pain research in animals. **Annual New York Academic Science**, 1983. v. 75, p. 128–132.

DWORKIN, R. H. *et al.* Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **Pain**, 2007. v. 132, n. 3, p. 237–251.

EGGER, T. *et al.* Vitamin E (alpha-tocopherol) attenuates cyclo-oxygenase 2 transcription and synthesis in immortalized murine BV-2 microglia. **The Biochemical journal**, 1 mar. 2003. v. 370, n. Pt 2, p. 459–67. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429020>>.

EREL O.A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**. Apr;37(4):277-8. 2004.

FABRE, G. *et al.* Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. **Chem. Commun.**, 2015. v. 51, n. 36, p. 7713–7716. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5CC00636H>>.

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, 2002. v. 18, n. 10, p. 872–879. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900702009164>>.

FINNERUP, N. B. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, 2015. v. 14, n. 2, p. 162–173.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, 1998. v. 201, p. 1203–1209.

GALLI, F. *et al.* Vitamin E: Emerging aspects and new directions. **Free Radical Biology and Medicine**, 2017. v. 102, n. September 2016, p. 16–36. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.017>>.

GEIS, C. *et al.* NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. **Experimental Neurology**, 2017. v. 288, p. 94–103. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.11.008>>.

GIL, Y. S. *et al.* Gabapentin inhibits the activity of the rat excitatory glutamate transporter 3 expressed in *Xenopus* oocytes. **European Journal of Pharmacology**, set. 2015. v. 762, p. 112–117. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299915300261>>.

GOECKS, C. S. B. *et al.* Assessment of Oxidative Parameters in Rat Spinal Cord After Chronic Constriction of the Sciatic Nerve. **Neurochemical Research**, 7 set. 2012. v. 37, n. 9, p. 1952–1958. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11064-012-0815-0>>.

GRACE, P. M. *et al.* Nitroxidative Signaling Mechanisms in Pathological Pain. **Trends in Neurosciences**, 2016. v. 39, n. 12, p. 862–879. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2016.10.003>>.

GRANGER, D.L.; TAINTOR, R.R.; BOOCKVAR, K.S.; HIBBS, J.B. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. **Methods in Enzymology**, v. 268, p.142-151, 1996.

GREGORY, N. S. *et al.* An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. **The Journal of Pain**, nov. 2013. v. 14, n. 11, p. 1255–1269. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526590013010985>>.

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

GUEDES, R. P. *et al.* Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. **Neurochemical Research**, 2006. v. 31, n. 5, p. 603–609.

GUO, J. *et al.* Effect and mechanism of inhibition of PI3K / Akt / mTOR signal pathway on chronic neuropathic pain and spinal microglia in a rat model of chronic constriction injury. 2017. v. 8, n. 32, p. 52923–52934.

GWAK, Y. S.; HULSEBOSCH, C. E.; LEEM, J. W. Review Article Neuronal-Glial Interactions Maintain Chronic Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. 2017. v. 2017.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W.B. Glutathione s-transferases. The first enzymatic in mercapturic acid formatin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B. *et al.* The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, 1995. v. 33, n. 7, p. 601–617.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants : updating a personal view. 2012. v. 70, n. 5, p. 257–265.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HAN, J. M. *et al.* Protective effects of ascorbic acid against lead-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo. **Brain Research**, 2007. v. 1185, n. 1, p. 68–74.

KIABI, HASANZADEH F. *et al.* Can Vitamin C Be Used as an Adjuvant for Managing Postoperative Pain? A Short Literature Review. **The Korean Journal of Pain**, 2013. v. 26, n. 2, p. 209. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3344/kjp.2013.26.2.209>>.

HARRISON, F. E.; MAY, J. M. Vitamin C Function in the Brain: Vital Role of the Ascorbate Transporter (SVCT2). **Free Radical Biology and Medicine**, 2009. v. 46, n. 6, p. 719–730.

HEGDE, B. *et al.* Vitamin E is a MIF Inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, fev. 2012. v. 418, n. 2, p. 384–389. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X1200054X>>.

HEHN, C. A. VON; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. **Neuron**, 2012. v. 73, n. 4, p. 638–652. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.008>>.

HEYDARI, M.; AHMADIZADEH, M.; AHMADI ANGALI, K. Ameliorative effect of vitamin E on trichloroethylene-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Nephropathology**, 20 dez. 2016. v. 6, n. 3, p. 168–173. Disponível em: <[http://nephropathol.com/Abstract/JNP\\_20170220205301](http://nephropathol.com/Abstract/JNP_20170220205301)>.

HILL, K. E. *et al.* Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. **The American journal of clinical nutrition**, jun. 2003. v. 77, n. 6, p. 1484–8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791628>>.

HORST, A. *et al.* Effect of N-acetylcysteine on the spinal-cord glutathione system and nitric-oxide metabolites in rats with neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, 2014. v. 569, p. 163–168. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.063>>.

HUANG, P.-H. *et al.* Vitamin E Facilitates the Inactivation of the Kinase Akt by the Phosphatase PHLPP1. **Science Signaling**, 19 mar. 2013. v. 6, n. 267, p. 19–29. Disponível em: <<http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scisignal.2003816>>.

HUANG, D.; HUANG, S.; GAO, H.; LIU, Y.; QI, J.; CHEN, P.; WANG, C.; SCRAGG, J.L.; VAKUROV, A.; PEERS, C.; DU, X.; ZHANG, H.; GAMPER, N. Redox-dependent modulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in sensory neurons contributes to acute anti-nociceptive effect of substance P. **Antioxidant Redox Signaling**, 2016, v. 25 n. 5. p. 233–251.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Review Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology. 2007. p. 365–376.

IASP, I. A. For The S. Of P. S. On Taxonomy. C. Of Chronic Pain. Description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, 2008. v. 3, p. S1–S226.

JAGGI, A. S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, fev. 2011. v. 25, n. 1, p. 1–28. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x>>.

JANES, K. *et al.* Bioenergetic deficits in peripheral nerve sensory axons during chemotherapy- induced neuropathic pain result from peroxynitrite mediated post-translational nitration of mitochondrial superoxide dismutase. **Pain**, 2013. v. 154, n. 11, p. 2432–2440. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.032>>.

JI, R.-R.; SUTER, M. R. p38 MAPK, Microglial Signaling, and Neuropathic Pain. **Molecular Pain**, 2007. v. 3, p. 1744–8069–3–33. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1186/1744-8069-3-33>>.

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

JIN, S. X. *et al.* P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Activated After a Spinal Nerve Ligation in Spinal Cord Microglia and Dorsal Root Ganglion Neurons and Contributes To the Generation of Neuropathic Pain. **Journal of Neuroscience**, 2003. v. 23, n. 10, p. 4017–4022.

JOVANOVIĆ, M. D. *et al.* Protective effects of glucose-6-phosphate dehydrogenase on neurotoxicity of aluminium applied into the CA1 sector of rat hippocampus. **The Indian journal of medical research**, jun. 2014. v. 139, n. 6, p. 864–72. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25109721>>.

JURGA, A. M. *et al.* Blockade of P2X4 Receptors Inhibits Neuropathic Pain-Related Behavior by Preventing MMP-9 Activation and, Consequently, Pronociceptive Interleukin Release in a Rat Model. **Frontiers in Pharmacology**, 16 fev. 2017. v. 8. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00048/full>>.

KALLENBORN-GERHARDT, W. *et al.* NOXious signaling in pain processing. **Pharmacology and Therapeutics**, 2013. v. 137, n. 3, p. 309–317.

KASHIF, S.M.; ZAIDI, R.; BANU, N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. **Clinica Chimica Acta**, 2004. v.340, n.229-233.

KATO, N. *et al.* Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury in vivo. **Journal of Neuroinflammation**, 3 dez. 2013. v. 10, n. 1, p. 757. Disponível em: <<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-10-1>>.

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

KIM, D. *et al.* NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 17 ago. 2010. v. 107, n. 33, p. 14851–14856. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009926107>>.

KIM, H. K. *et al.* Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. **Pain**, 2006. v. 122, n. 1–2, p. 53–62. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16524661](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16524661)>.

KIM, H. K. *et al.* Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, 2004. v. 111, n. 1, p. 116–124. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006396-200409000-00015>>.

KIM, H. Y. *et al.* the Responsiveness of Dorsal Horn Neurons and Induce Mechanical Hyperalgesia in Rats. 2015. v. 2015, p. 1–11.

KIM, M. J. *et al.* Antinociceptive effects of intraperitoneal and intrathecal vitamin E in the rat formalin test. **Korean Journal of Pain**, 2012. v. 25, n. 4, p. 238–244.

KIM, M. S. *et al.* A Study of Intravenous Administration of Vitamin C in the Treatment of Acute Herpetic Pain and Postherpetic Neuralgia. **Annals of Dermatology**, 2016. v. 28, n. 6, p. 677. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5021/ad.2016.28.6.677>>.

KLUSÁKOVÁ, I.; DUBOVÝ, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – An anatomical perspective. **Annals of Anatomy -**

**Anatomischer Anzeiger**, jan. 2009. v. 191, n. 3, p. 248–259. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0940960209000375>>.

KOMATSU, W. *et al.* Nasunin inhibits the lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory mediator production in RAW264 mouse macrophages by suppressing ROS-mediated activation of. **Bioscience**, 2017. v. 8451, n. August, p. 1–11. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09168451.2017.1362973>>.

KRINSKY, N. I. *et al.* **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**. Washington: National Academies Press, 2000.

KUKKAR, A. *et al.* Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. **Archives of Pharmacal Research**, 2013. v. 36, n. 3, p. 237–251.

LANGLEY, P. C.; RUIZ-IBAN, M. A. Original article The association of pain with labor force participation , absenteeism , and presenteeism in Spain No Cop Un t yr au fo ig th r ht di or S sp ize a la d le © vi e o ew p r o n d p ibi m rin ted m fo rm t a . Au e si th rc a U ng or i le is . 2011. v. 14, n. 6, p. 835–845.

LEE, J. Y.; CHOI, H. Y.; YUNE, T. Y. Fluoxetine and vitamin C synergistically inhibits blood-spinal cord barrier disruption and improves functional recovery after spinal cord injury. **Neuropharmacology**, out. 2016. v. 109, p. 78–87. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390816302167>>.

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

LI, F. *et al.* Superoxide Mediates Direct Current Electric Field-Induced Directional Migration of Glioma Cells through the Activation of AKT and ERK. **PLoS ONE**, 2013. v. 8, n. 4.

LI, R. *et al.* Vitamin C enhances the analgesic effect of gabapentin on rats with neuropathic pain. **Life Sciences**, 2016. v. 157, p. 25–31. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.05.035>>.

LITTLE, J. W.; DOYLE, T.; SALVEMINI, D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: Determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. **Amino Acids**, 2012. v. 42, n. 1, p. 75–94.

LIU, W.; LV, Y.; REN, F. PI3K/Akt Pathway is Required for Spinal Central Sensitization in Neuropathic Pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2017. n. 35. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10571-017-0541-x>>.

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

LU, R. *et al.* Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury. **PLoS ONE**, 2011. v. 6, n. 12, p. 1–9.

MAGRINELLI, F.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. **Practical Neurology**, 2013. v. 13, n. 5, p. 292–307. Disponível em: <<http://pn.bmj.com/lookup/doi/10.1136/practneurol-2013-000536>>.

MASON, S. A. *et al.* Ascorbic acid supplementation improves skeletal muscle oxidative stress and insulin sensitivity in people with type 2 diabetes: Findings of a randomized controlled study. **Free Radical Biology and Medicine**, 2016. v. 93, p. 227–238. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.006>>.

MAY, J. M. Vitamin C Transport and Its Role in the Central Nervous System. [S.l.]: [s.n.], 2012, p. 85–103.

MEACHAM, K. *et al.* Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. **Current Pain and Headache Reports**, 2017. v. 21, n. 6.

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

MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, 1993. v. 52, n. 2, p. 127–136.

MEYMANDI, M. S. *et al.* The effects of co-administration of pregabalin and vitamin E on neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation in male rats. **Inflammopharmacology**, 2017. v. 25, n. 2, p. 237–246.

MONTE-RASO, V.V.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. FAZAN, V.P.S. Os efeitos do ultrassom terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. **Revista Brasileira de Fisioterapia** 2006, v.10, n.1, p.113-119.

MORANI, A. S.; BODHANKAR, S. L. Early co-administration of vitamin E acetate and methylcobalamin improves thermal hyperalgesia and motor nerve conduction velocity following sciatic nerve crush injury in rats. **Pharmacological reports : PR**, 2010. v. 62, n. 2, p. 405–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508297>>.

MUTHURAMAN, A.; SINGH, N. Neuroprotective effect of saponin rich extract of *Acorus calamus* L. in rat model of chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve-induced neuropathic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, 2012. v. 142, n. 3, p. 723–731.

NAIK, A. K. *et al.* Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. **European Journal of Pain**, 2006. v. 10, n. 7, p. 573–579.

NAKAZATO-IMASATO, E.; KUREBAYASHI, Y. Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Life Sciences**, 2009. v. 84, n. 17–18, p. 622–626. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2009.02.014>>.

NASCIMENTO, P. R. C. Do; COSTA, L. O. P. Prevalência da dor lombar no Brasil: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, jun. 2015. v. 31, n. 6, p. 1141–1156. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2015000601141&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2015000601141&lng=pt&tlng=pt)>.

NAZIROĞLU, M.; ÖZGÜL, C. Vitamin e modulates oxidative stress and protein kinase C activator (PMA)-induced TRPM2 channel gate in dorsal root ganglion of rats. **Journal of**

**Bioenergetics and Biomembranes**, 2013. v. 45, n. 6, p. 541–549.

NELSON, M. T. *et al.* Molecular Mechanisms of Subtype-Specific Inhibition of Neuronal T-Type Calcium Channels by Ascorbate. **Journal of Neuroscience**, 14 nov. 2007. v. 27, n. 46, p. 12577–12583. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2206-07.2007>>.

NI, H. D. *et al.* Glial activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. **Journal of Neuroscience Research**, 2016. v. 94, n. 1, p. 50–61.

NICKEL, F. T. *et al.* Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, 2012. v. 22, n. 2, p. 81–91.

OBARA, I. *et al.* Systemic inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway reduces neuropathic pain in mice. **Pain**, nov. 2011. v. 152, n. 11, p. 2582–2595. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006396-201111000-00021>>.

OLIVEIRA, B. F. DE *et al.* Ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene reduce oxidative stress and proinflammatory cytokines in mononuclear cells of Alzheimer's disease patients. **Nutritional Neuroscience**, 2012. v. 15, n. 6, p. 244–251. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/1476830512Y.0000000019>>.

PARK, J. *et al.* Antiallodynic effects of vitamin C and vitamin E in chronic post-ischemia pain rat model. **Korean journal of**, 2013. v. 65, n. 5, p. 442–448. Disponível em: <<http://synapse.koreamed.org/search.php?where=aview&id=10.4097/kjae.2013.65.5.442&code=0011KJAE&vmode=FULL>>.

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

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

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

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

PIZZINO, G. *et al.* Review Article Oxidative Stress : Harms and Benefits for Human Health. 2017. v. 2017.

POLJSAK, B. *et al.* ROS and antioxidants: whAchieving the balance between en to use the synthetic antioxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2013. v. 2013, p. 956792. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23738047%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3657405>>.

POPIOLEK-BARCZYK, K.; MIKA, J. Targeting the microglial signaling pathways: new insights in the modulation of neuropathic pain. **Current medicinal chemistry**, 2016. p. 2908–2928. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281131>>.

PORTUGAL, C. C. *et al.* Caveolin-1–mediated internalization of the vitamin C transporter SVCT2 in microglia triggers an inflammatory phenotype. **Science Signaling**, 2017. v. 10, n. 472, p. eaal2005. Disponível em: <<http://stke.sciencemag.org.pitt.idm.oclc.org/content/sigtrans/10/472/eaal2005.full.pdf%0Ahttp://stke.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scisignal.aal2005>>.

REBEC, G. V.; CHRISTOPHER PIERCE, R. A vitamin as neuromodulator: Ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. **Progress in Neurobiology**, 1994. v. 43, n. 6, p. 537–565.

RICE, M. E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends Neurosci**, 2000. v. 23, n. 5, p. 209–216.

RICE, M. E. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: A Dynamic Neuromodulator. **Neuroscientist**, 2012. v. 17, n. 4, p. 389–406.

\_\_\_\_\_; RUSSO-MENNA, I. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. **Neuroscience**, fev. 1998. v. 82, n. 4, p. 1213–23. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466441>>.

RIMBACH, G.; MINIHANE, A. Regulation of cell signalling by vitamin E. **Proceedings of the Nutrition Society**, 2002. v. 61, n. 4, p. 415–425. Disponível em: <[http://journals.cambridge.org/abstract\\_s0029665102000423](http://journals.cambridge.org/abstract_s0029665102000423)>.

RIZVI, S. *et al.* The role of Vitamin E in human health and some diseases. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, 2014. v. 14, n. 2, p. 157–165.

ROBACZEWSKA, J. *et al.* Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, jun. 2016. v. 67, n. 3, p. 331–7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27511994>>.

ROBERT, S. M. *et al.* Role of glutamate transporters in redox homeostasis of the brain. **Neurochemistry International**, jul. 2014. v. 73, p. 181–191. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018614000023>>.

ROMEIS, B. Taschenbuch d. mikrosk. **Technik. Munich**, Oldenbourg, 1928

ROSA, K. A. *et al.* Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neuroscience Letters**, jun. 2005. v. 381, n. 1–2, p. 185–188. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394005002089>>.

SAFFARPOUR, S.; NASIRINEZHAD, F. Functional interaction between N-methyl-D-aspartate receptor and ascorbic acid during neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve. 2017.

SALVEMINI, D. *et al.* Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free radical biology & medicine**, 2011. v. 51, n. 5, p. 951–66. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277369>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3134634>>.

SALVEMINI, D.; NEUMANN, W. L. Peroxynitrite: a strategic linchpin of opioid analgesic tolerance. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2009. v. 30, n. 4, p. 194–202.

SANTOS, F. *et al.* The neural mobilization technique modulates the expression of endogenous opioids in the periaqueductal gray and improves muscle strength and mobility in rats with neuropathic pain. **Behavioral and Brain Functions**, 2014. v. 10, n. 1, p. 19. Disponível em: <<http://behavioralandbrainfunctions.biomedcentral.com/articles/10.1186/1744-9081-10-19>>.

SAUER, R. S. *et al.* Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte deficiency in peripheral neuropathy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2017. p. 1–18.

SCHEID, T. **Efeitos da administração de uma fração antioxidante de *schinus terebinthifolius* sobre parâmetros nociceptivos e de estresse oxidativo em sistema nervoso central de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática.** 2014. 113 páginas. Tese de doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SCHEID, T. *et al.* Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. **Neurochemical Research**, 2013. v. 38, n. 5, p. 935–942.

SELVARAJU, T. R. *et al.* The neuroprotective effects of tocotrienol rich fraction and alpha tocopherol against glutamate injury in astrocytes. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, 2014. v. 14, n. 4, p. 195–204.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free radical biology & medicine**, nov. 1999. v. 27, n. 9–10, p. 916–21. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569624>>.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, 1991. p. 31–31.

SIES, H. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**. 2014; v.28; n.289 p.8735-8741.

SON, Y. *et al.* Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? **Journal of Signal Transduction**, 2011. v. 2011, p. 1–6. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jst/2011/792639/>>.

SØGAARD, D. *et al.* In vivo vitamin C deficiency in guinea pigs increases ascorbate transporters in liver but not kidney and brain. **Nutrition Research**, 2014. v. 34, n. 7, p. 639–645. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2014.07.004>>.

STEPHENSON, C. M. *et al.* Phase I clinical trial to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose intravenous ascorbic acid in patients with advanced cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 14 jul. 2013. v. 72, n. 1, p. 139–146. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00280-013-2179-9>>.

STOICEA, N. *et al.* Opioid-induced hyperalgesia in chronic pain patients and the mitigating

effects of gabapentin. **Frontiers in Pharmacology**, 27 maio. 2015. v. 6. Disponível em: <<http://www.frontiersin.org/Neuropharmacology/10.3389/fphar.2015.00104/abstract>>.

SUN, R.; YAN, J.; WILLIS, W. D. Activation of protein kinase B/Akt in the periphery contributes to pain behavior induced by capsaicin in rats. **Neuroscience**, jan. 2007. v. 144, n. 1, p. 286–294. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452206011705>>.

QU, Y.J.; ZHANG, X.; FAN, Z.Z.; HUAI, J. TENG, Y.B.; ZHANG, T. et al. Effect of TRPV4-p38 MAPK Pathway on Neuropathic Pain in Rats with Chronic Compression of the Dorsal Root Ganglion. **Biomed Research Internacional**, 2016; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6978923>

THOMPSON, W. L.; ELDIK, L. J. VAN. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-7 through NFκB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes. **Brain Research**, set. 2009. v. 1287, p. 47–57. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899309013250>>.

TIAN, H. *et al.* SVCT2, a potential therapeutic target, protects against oxidative stress during ethanol-induced neurotoxicity via JNK/p38 MAPKs, NF-κB and miRNA125a-5p. **Free Radical Biology and Medicine**, 2016. v. 96, p. 362–373. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.039>>.

TIROSH, O. *et al.* Cellular and mitochondrial changes in glutamate-induced HT4 neuronal cell death. **Neuroscience**, 2000. v. 97, n. 3, p. 531–541.

TIWARI, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Tocotrienol ameliorates behavioral and biochemical alterations in the rat model of alcoholic neuropathy. **Pain**, 2009. v. 145, n. 1–2, p. 129–135. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2009.05.028>>.

TOMPKINS, D. A.; HOBELMANN, J. G.; COMPTON, P. Providing chronic pain management in the “Fifth Vital Sign” Era: Historical and treatment perspectives on a modern-day medical dilemma. **Drug and Alcohol Dependence**, abr. 2017. v. 173, p. S11–S21. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376871617300030>>.

TRABER, M. G. Vitamin E Regulatory Mechanisms. **Annual Review of Nutrition**, ago. 2007. v. 27, n. 1, p. 347–362. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093819>>.

\_\_\_\_\_; STEVENS, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free Radical Biology and Medicine**, set. 2011. v. 51, n. 5, p. 1000–1013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584911003194>>.

VAN HECKE, O. *et al.* Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**, abr. 2014. v. 155, n. 4, p. 654–662. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006396-201404000-00004>>.

VANHOOK, A. Vitamin C prevents microglia activation. **Science**, 31 mar. 2017. v. 355, n. 6332, p. 1386.18–1388. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.355.6332.1386-r>>.

VINCENT, K. *et al.* Spinal intracellular metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) contributes to pain and c-fos expression in a rat model of inflammatory pain. **Pain**, 2017. v. 158, n. 4, p. 705–16.

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

WANG, B.; FAN, B.; DAI, Q.; XU, X.; JIANG, P.; ZHU, L.; DAI, H.; YAO, Z.; XU, Z.; LIU, X.; Fascin-1 contributes to neuropathic pain by promoting inflammation in rat spinal cord. **Neurochemical Research**, 2017. p.1-10. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11064-017-2420-8>>.

WAWRZYNIAK, A. *et al.*  $\alpha$ -Tocopherol, ascorbic acid, and  $\beta$ -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress. **Nutrition Research**, out. 2013. v. 33, n. 10, p. 868–875. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531713001553>>.

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

WOLF, G.  $\sigma$ -Tocopherol: An Efficient Protector of Lipids Against Nitric Oxide-initiated Peroxidative Damage. **Nutrition Reviews**, 27 abr. 2009. v. 55, n. 10, p. 376–378. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.1997.tb01566.x>>.

WOLLER, S. A. *et al.* An overview of pathways encoding nociception. 2017.

XU, J.-T. *et al.* Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. **Experimental Neurology**, ago. 2007. v. 206, n. 2, p. 269–279. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488607002002>>.

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

YOWTAK, J. *et al.* Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. **Pain**, 2011. v. 152, n. 4, p. 844–852. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.034>>.

ZAREBKOHAN, A. *et al.* Effect of chronic administration of morphine on the gene expression level of sodium-dependent vitamin C transporters in rat hippocampus and lumbar spinal cord. **Journal of Molecular Neuroscience**, 2009. v. 38, n. 3, p. 236–242.

ZHAO, H. *et al.* The role of microglia in the pathobiology of neuropathic pain development: What do we know? **British Journal of Anaesthesia**, 2017. v. 118, n. 4, p. 504–516.

ZHAO, Y. *et al.* ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. **Molecular Cancer**, 2017. v. 16, n. 1, p. 79. Disponível em: <<http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-017-0648-1>>.

ZHOU, L.; CHEN, H. Prevention of Contrast-Induced Nephropathy with Ascorbic Acid. **Internal Medicine**, 2012. v. 51, n. 6, p. 531–535.

ZHOU, Z. *et al.* Phosphorylated neuronal nitric oxide synthase in neuropathic pain in rats. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, 2015. v. 8, n. 10, p. 12748–12756.

ZHUO, M. Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain. **Neuropharmacology**, 2016. v. 112, p. 1–7.

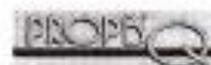
## ANEXO I



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23352

**Título:** PARÂMETROS NOCICEPTIVO, OXIDATIVO E NITROSATIVO E SISTEMA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA TRATADOS COM &#945;-TOCOFEROL E ÁCIDO ASCÓRBICO

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

WANIA APARECIDA PARTATA - coordenador de 01/01/2013 até 30/12/2016  
MAIRA SILMARA DE MORAES - pesquisador de 01/01/2013 até 30/12/2016  
Andréa Horst - Aluno de Doutorado de 01/01/2013 até 30/12/2016  
CAROLINA KOLBERG - Aluno de Doutorado de 01/01/2013 até 30/12/2016  
Taina Scheid - Aluno de Doutorado de 01/01/2013 até 30/12/2016

**Equipe Externa:**

Ana Paula Konzen Riffel - pesquisador de 01/01/2013 até 30/12/2016

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 288 ratos Wistar machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Quinta-Feira, 13 de Dezembro de 2012

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética