



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MAISA OLIVEIRA DE FREITAS

**EFEITOS REGENERATIVO E ANALGÉSICO DOS
EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOOLICO DE *Caesalpineia*
ferrea MARTIUS NA NEUROPATIA CIÁTICA
EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Médica Veterinária

Zootecnista

**MOSSORÓ
AGOSTO DE 2013**

MAISA OLIVEIRA DE FREITAS

**EFEITOS REGENERATIVO E ANALGESICO DOS
EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOOLICO DE *Caesalpineae*
ferrea MARTIUS NA NEUROPATIA CIÁTICA
EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido– UFERSA,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de
Oliveira – UFERSA.

MOSSORÓ
AGOSTO DE 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MAISA OLIVEIRA DE FREITAS

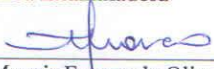
**EFEITOS REGENERATIVO E ANALGÉSICO DOS
EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOOLICO DE
Caesalpinia ferrea MARTIUS NA NEUROPATIA CIÁTICA
EXPERIMENTAL EM RATOS.**

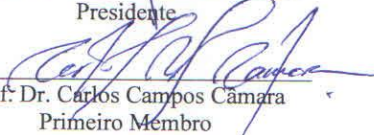
Dissertação apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido– UFERSA,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

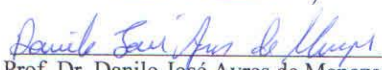
Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de
Oliveira – UFERSA.

Aprovada em __/__/__

Banca Examinadora


Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira
Presidente


Prof. Dr. Carlos Campos Câmara
Primeiro Membro


Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes
Segundo Membro

MOSSORÓ
AGOSTO DE 2013

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Maisa Oliveira de Freitas, natural do município de Natal, estado do Rio Grande do Norte, nascida em 27 de novembro de 1980, filha de Marcos Antunes de Freitas e Maria das Graças Oliveira de Freitas. Graduiu-se em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte no ano de 2006, sendo neste período estagiária da Secretaria de Agricultura Pecuária e Abastecimento e da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Norte. No ano de 2011 graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido, onde foi monitora da disciplina de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais e aluna de iniciação científica, trabalhando com neuropatia experimental periférica em ratos.

A Maria das Graças Oliveira de Freitas,
minha querida mãe, que com toda dificuldade
imposta pela vida, sempre orou e se dedicou
inteiramente a um futuro promissor para seus
filhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela fé e perseverança energizadas nos momentos de alegria e dificuldade durante todos os dias de minha vida.

Aos meus pais Marcos Antunes de Freitas e Maria das Graças Oliveira de Freitas pela dedicação a minha formação educacional e profissional desde sempre.

Aos meus irmãos Marcos Junior e Marcelo Oliveira e suas respectivas esposas Lírian Figueiredo e Ângela Lira, e a minha sobrinha Lairinha, que Deus abençoe seu nascimento em outubro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos convênios e auxílios concedidos para viabilização desta dissertação.

Ao meu orientador e co-orientador, respectivamente, Professor Dr. Moacir Franco de Oliveira e Professor Dr. Carlos Campos Câmara pela paciência, disponibilidade e por acreditar na realização deste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia: Aline Costa, Ana Karla Nunes, Cinthia Balduino, Cintia Kelly Costa, José Carlos Pereira, Uderlângia Marinho e do Laboratório de Morfofisiologia Animal: Ferdinando Bezerra, Gleidson Benevides e Roberto Sávio, pelo apoio durante as várias etapas desses dois anos de pesquisa.

Aos amigos que estiveram presentes no meu dia a dia: Augusto Neto, Rebeca Milfont, Érika Aparecida dos Santos, Fernanda Medeiros, Ana Beatriz Alves, Stefferson Lucas, Mikael Lima, Gizélia Guedes, José Newton Araújo, Milzete Alves, Anne Emmanuelle Câmara, Artur Soares, Paulo César, Yurannê Moraes, pelos momentos de descontração, dificuldades superadas, e acima de tudo pelo sentimento positivo.

Aos animais que foram fruto principal da realização deste trabalho ao longo dos últimos dois anos.

“E nossa história não estará pelo avesso assim, sem final feliz. Teremos coisas bonitas pra contar. E até lá vamos viver. Temos muito ainda por fazer.” (Renato Russo).

RESUMO

EFEITO REGENERATIVO E ANALGESICO DOS EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOOLICO DE *Caesalpineia ferrea* MARTIUS NA NEUROPATIA CIÁTICA EXPERIMENTAL EM RATOS

FREITAS, Maisa Oliveira de. **Estudo dos efeitos regenerativo e analgesico dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *Caesalpineia ferrea* Martius na neuropatia ciática experimental em ratos.** 2013, 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

Este estudo avaliou os efeitos regenerativo e analgésico do extrato aquoso (EACF) e hidroalcoólico (EHCF) da vagem do jucá na neuropatia ciática experimental e na dor periférica não neuropática em ratos, em uma dose diária de 300 mg/kg. Foram utilizados 82 ratos machos da linhagem Wistar, distribuídos da seguinte forma: 40 animais neuropáticos divididos em quatro grupos de dez animais, tratados com o EAFC, EHCF, solução salina e um pseudo-operado. Quarenta e dois animais foram distribuídos em seis grupos de sete animais cada, sendo três para realização de testes de contorção abdominal induzida por ácido acético e três para realização de teste térmico induzido por carragenina. Os grupos receberam tratamentos com EAFC, EHCF e solução salina. Estudos comportamentais espontâneos (motricidade e dor) e induzidos (hiperalgesia e reflexos) foram avaliados, não havendo diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados, entretanto nos comportamentos induzidos de pinçar interdigital e lateral da região plantar, houve uma diferença significativa entre os grupos tratados com os extratos e tratados com solução salina, , sugerindo um efeito analgésico. A dose de 300mg/kg de EACF e EHCF na neuropatia traumática experimental não pode ser utilizada como analgésico, porém sugerem a existência de efeitos analgésicos para os comportamentos induzidos de pinçar. Os resultados histológicos sugerem uma maior integridade axonal dos animais tratados com os extractos, semelhante ao grupo Sham.

Palavras-chave: Comportamento induzido, jucá, hiperalgesia, alodinia, nervo ciático

ABSTRACT

FREITAS, Maisa Oliveira de. **REGENERATIVE AND ANALGESIC EFFECTS OF AQUEOUS AND HYDROALCOHOLIC EXTRACTS OF *Caesalpinia ferrea* IN EXPERIMENTAL SCIATIC NEUROPATHY IN RATS.** 2013, 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

This study aimed to evaluate the regenerative and analgesic effects of the aqueous and hydroalcoholic extract of *Caesalpinia ferrea* pods – daily dosage of 300 mg/kg – on experimental sciatic neuropathy and non-neuropathic peripheral pain. An amount of 82 male Wistar rats was used in the experiment. There were 40 neuropathic rats divided in four groups of ten animals. They were treated with aqueous extract, hydroalcoholic extract, saline solution, and one them was pseudo-operated. The other 42 rats were distributed in six groups of seven animals. Three groups were led to writhing test induced by acetic acid administration, and the other three groups to termal test induced by carrageenan. The groups had different treatments with aqueous and hydroalcoholic extract and saline solution. Spontaneous (motor and pain) and induced (hyperalgesia and flare) behavioural studies were conducted. There were not significant difference between the groups treated or not with the extracts. However, in the third week, the induced behaviors of interdigital and lateral pinch presented significant difference between the groups treated with extracts and the ones treated with saline solution, which suggests analgesic effect for this behaviour. The dosage of 300 mg/kg of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Caesalpinia ferrea* pods in the experimental traumatic sciatic neuropathy may not be used as analgesic. This dosage suggests analgesic effects for the induced behaviour of pinch. It shows they may be tested in studies evaluating axonal regeneration. Histological results suggest a higher axonal integrity in animals treated with the extracts, similar to the sham group.

Keywords: induced behaviour; *Caesalpinia ferrea*; hyperalgesia; allodynia; sciatic nerve.

LISTA DE ABREVIATURAS

IASP	International Association for The Study of Pain
ANOVA	Teste estatístico da análise de variância
Comporta®	Software de registro de comportamentos espontâneos
EACF	Extrato aquoso da <i>Caesalpineia ferrea</i>
EHCF	Extrato hidroalcoolico da <i>Caesalpineia ferrea</i>
H-E	Hematoxilina - Eosina
LabRat®	Software de registro de comportamentos espontâneos
Paraplast	Nome fantasia de parafina
Sham	Animais pseudo-operados

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição dos grupos de animais. Tratamento diário dos animais no decorrer de três semanas de indução neuropática por CCNC.....	31
Tabela 2. Distribuição dos grupos de animais. Tratamento único de dor induzida por ácido acético e carragenina.....	31
Tabela 3. Comportamento espontâneo de andar observado em ratos submetidos a CCNC.....	38
Tabela 4. Comportamento espontâneo de empinar observado em ratos submetidos a CCNC.....	39
Tabela 5. Comportamento espontâneo de coçar observado em ratos submetidos a CCNC.....	39
Tabela 6. Comportamento induzido de hiperalgesia térmica ao frio (acetona) observado em ratos submetidos a CCNC.....	40
Tabela 7. Comportamento induzido de hiperalgesia térmica ao calor (banho-maria) observado em ratos submetidos a CCNC.....	40
Tabela 8. Comportamento induzido de reflexo extensor observado em ratos submetidos a CCNC.....	41
Tabela 9. Comportamento induzido de reflexo flexor observado em ratos submetidos a CCNC.....	42
Tabela 10. Comportamento induzido de pinçar interdigital observado em ratos submetidos a CCNC.....	42
Tabela 11. Comportamento induzido de pinçar lateral observado em ratos submetidos a CCNC.....	43
Tabela 12. Comportamento induzido de contorção abdominal por ácido acético.....	43
Tabela 13. Comportamento induzido por carragenina no teste de hiperalgesia térmica.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Corte transversal de nervo ciático de ratos do grupo <i>sham</i>	44
Figura 2 Corte transversal de nervo ciático de ratos do grupo tratado com solução salina.....	45
Figura 3 Corte transversal de nervo ciático de ratos do grupo tratado com EACH.....	46
Figura 4 Corte transversal de nervo ciático de ratos do grupo tratado com EHCF.....	46

SUMÁRIO

	Pagina
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ANATOMIA DO NERVO PERIFÉRICO	20
2.2 LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	21
2.3 RECUPERAÇÃO DO SISTEMA PERIFÉRICO APÓS LESÃO	22
2.4 USO DE FITOTERÁPICOS NA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	24
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A <i>Caesalpineia férrea</i>	25
2.6 ESTUDO QUÍMICO DA <i>Caesalpineia férrea</i>	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	29
4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	29
4.3 PRODUÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA <i>Caesalpineia ferrea</i>	29
4.4 PRODUÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DA <i>Caesalpineia</i> <i>ferrea</i>	30
4.5 ANIMAIS	30
4.6 TRATAMENTO DOS ANIAMAIS	31
4.7 MODELO DE INDUÇÃO DE CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO	32
4.8 OBSERVAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS ESPONTÂNEOS	32
4.9 TESTE DE SENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO	33
4.10 TESTES DE REFLEXOS	34
4.11 TESTE DE SENSIBILIDADE TÉRMICA AO BANHO-MARIA	34
4.12 MODELO DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDO POR	

	ÁCIDO ACÉTICO	35
4.13	MODELO DE HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDO POR CARRAGENINA	36
4.14	EUTANÁSIA	36
4.15	PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ	37
4.16	ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS	38
5.1	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS NEUROPÁTICOS	38
5.1.1	COMPORTAMENTOS ESPONTÂNEOS QUE EXPRESSAM MOTRICIDADE (ANDAR E EMPINAR)	38
5.1.2	COMPORTAMENTO ESPONTÂNEO DE COÇAR	39
5.1.3	COMPORTAMENTO INDUZIDO POR HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO	40
5.2	EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO E HIDROALCOOLICO NOPS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS	41
5.2.1	TESTES DE REFLEXOS	41
5.2.2	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS ANIMAIS NEUROPÁTICOS INDUZIDOS POR CONTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO ...	44
6	DISCUSSÃO	47
6.1	COMPORTAMENTOS ESPONTÂNEOS	47
6.1.1	EXPRESSÃO DE MOTRICIDADE (ANDAR E EMPINAR)	47
6.1.2	EXPRESSÃO DE DOR (COÇAR).	48
6.2	COMPORTAMENTOS INDUZIDOS	48
6.2.1	HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO E AO CALOR	49
6.2.2	REFLEXO EXTENSOR E FLEXOR	50
6.2.3	REFLEXO DE RETIRADA INTERDIGITAL E LATERAL	51
6.2.4	TESTE DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO	
		51
6.2.5	TESTE DE HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA POR	

	CARRAGENINA	52
6.2.6	MORFOLOGIA DOS NERVOS CIÁTICOS	54
7	CONCLUSÃO	56
8	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A *International Association for the Study of Pain* (IASP) definiu a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual presente ou em potencial” (IASP, 1983), sendo sempre subjetiva, pois cada indivíduo expressa a sua dor de acordo com o aprendizado frente as suas experiências prévias (CÂMARA, 2009).

A dor pode ser classificada quanto à sua duração: “dor transitória”, cuja função é proteger o organismo de lesões físicas que possam ser provocadas por agentes nocivos do ambiente ou por estresse excessivo em alguma parte dele, “dor aguda”, que pode persistir por poucos dias ou semanas, porém se a sensação dolorosa exceder este período será classificada como “dor crônica”, que pode persistir mesmo depois da recuperação das lesões ou doenças que a originaram (LOESER e MELZACK, 1999).

A lesão nervosa periférica é uma patologia bastante comum, seja na clínica médica humana ou na clínica médica veterinária com causas variadas, tendo como consequência a dor neuropática, resultado de lesões de origem traumática nos nervos periféricos, resultando em perda ou diminuição da sensibilidade e motricidade do território inervado, cuja severidade dependerá do acometimento de suas estruturas (ENDO, 2002). Nesta patologia, os nervos podem produzir dor, perda da sensação e inabilidade no controle dos músculos, além de sensação de alfinetadas e agulhadas, dormência e formigamento que são frequentemente distribuídos em todo o nervo afetado (MORANI et al., 2012) e que muitas vezes resulta em déficits funcionais em longo prazo (JANG; CHO; CHOI, 2012).

Em pacientes, a recuperação morfológica e funcional após uma lesão nervosa, raramente é completa, apesar de aplicação de técnicas modernas sofisticadas de reconstrução. Esse fato deve-se a inúmeros fatores que influenciam na regeneração da fibra nervosa, incluindo a natureza e o nível da lesão, o tempo de desnervação, o tipo e o diâmetro das fibras afetadas, a idade do indivíduo e outras variáveis individuais (MONTE-RASO et al., 2005).

Diferentemente do que se observa no sistema nervoso central, lesões axonais no sistema nervoso periférico frequentemente resultam em um maior grau de regeneração espontânea. Esta capacidade de regeneração é determinada principalmente pela presença de um ambiente permissivo ao crescimento axonal. Entretanto, é clinicamente reconhecido que a recuperação

funcional de pacientes após lesões no sistema nervoso periférico se dá de forma incompleta ou pode não ocorrer (GORDON et al., 2003).

Pesquisas têm sido desenvolvidas com o fim de investigar diferentes formas de estimular a regeneração do nervo ciático de ratos, com a estimulação elétrica (MENDONÇA; BARBIERI; MAZZER, 2003), o ultrassom terapêutico (MONTE-RASO et al., 2005) o laser de baixa intensidade (ENDO, 2002), a irradiação ultrassônica pulsada de baixa intensidade (MONTE-RASO et al., 2006), a influência do exercício imediato em esteira (SOBRAL et al., 2008), além do uso fitoterápicos, na forma de extrato de plantas, como por exemplo, a *Achyranthes bidentata* que acelera a regeneração nervosa periférica (DING; CHENG; GU, 2008), a *Acorus calamus* e *Butea monosperma* que possuem efeito neuroprotetor após indução nervosa periférica em ratos (MUTHURAMAN; SINGH, 2011; THIAGARAJAN, et al., 2012).

O modelo de lesão por esmagamento do nervo ciático de ratos é usado em pesquisas sobre regeneração nervosa, por ser anatomicamente de fácil manipulação, por manter elementos que sustenta a estrutura nervosa e por não necessitar de um complemento cirúrgico que possa introduzir variáveis de difícil controle (ANDRAUS, 2009).

Nos dias atuais, nota-se um retorno do interesse pelas plantas medicinais, devido à grande procura por terapias alternativas. Isto se deve principalmente à ineficiência de alguns produtos sintéticos, ao alto custo dos medicamentos alopáticos e à busca da população por tratamentos menos agressivos ao organismo (RIBEIRO et al., 2005).

A Organização Mundial da Saúde considera a fitoterapia nos seus programas e sugere procedimentos básicos para validação de drogas vegetais, devido a pobreza e a falta de acesso a medicina moderna, uma vez que cerca de 65-80% da população mundial vive em países em desenvolvimento e dependem essencialmente de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades (RATES, 2001).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, com mais de 56.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (GIULIETTI et al., 2005), sendo que 8% foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais com 512 plantas registradas para comercialização no Ministério da Saúde (CARVALHO et al., 2008).

A *Caesalpineia ferrea* é uma árvore robusta pertencente à família leguminosae, da subfamília Caesalpinioideae que cresce em todo o Brasil, sendo largamente distribuída nas

regiões Norte e Nordeste, conhecida vulgarmente por jucá ou pau-ferro (PETERS et al., 2008), em que seu uso popular é comum na terapia de algumas enfermidades, sendo estudada para várias ações farmacológicas, reforçando seus fins terapêuticos.

Nakamura e colaboradores (2002) mostraram *in vitro* que compostos isolados da vagem da *Caesalpineia ferrea* possuem um efeito antitumoral quimiopreventivo.

Souza e colaboradores (2009) comprovaram que o extrato aquoso da casca da *Caesalpineia ferrea* administrado em dose única de 200 mg/Kg em ratos tem um efeito anti-hiperglicemiante significativo, através de ensaios farmacológicos de tolerância a glicose, o que pode indicar uma possível ação antidiabética, anti-hiperglicemiante significativa em ratos normoglicêmicos o que pode indicar um potencial antidiabético, reforçando as descrições de Bragança (1996) sobre esta característica anti diabéticas do jucá.

Mello e Mello (2006) testaram um fitoterápico a base de extrato de *Caesalpineia ferrea* para avaliação do reflexo da tosse em ratos expostos por aerossóis de ácido cítrico 5%, apresentando uma eficácia antitussígena.

Menezes e colaboradores em 2007 descreveram que o extrato aquoso da casca da *Caesalpineia ferrea* causa hipotensão associado à taquicardia, descrevendo um potencial clínico para doenças cardiovasculares.

Nozakiet al(2007) avaliaram que substâncias químicas isoladas do caule da *Caesalpinia ferrea* possui atividade inibitória potente contra topoisomerase de DNA tipo II , que é um alvo importante dos fármacos anticancerígenos, além disso induziu uma apoptose em células mielóide na leucemia humana aguda.

Até o presente momento, não há registros na literatura do uso do estrato aquoso e/ou hidroalcoólico da *Caesalpinia ferrea* que contribua para a regeneração nervosa periférica em ratos, o que justificou a realização deste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA DO NERVO PERIFÉRICO

Durante a evolução dos metazoários surgiram dois sistemas de integração para coordenar as funções dos vários órgãos especializados que aparecem nesses animais: os sistemas nervoso e endócrino (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Nos vertebrados, após a fecundação, o óvulo passa por uma série de divisões celulares denominadas clivagens. O embrião pluricelular recebe o nome de blástula, convertendo-se em gástrula por meio de processos chamados de gastrulação. A gástrula transforma-se em nêurula, formando camadas germinativas que originam o sistema nervoso central. A camada interna de tecido do embrião é denominada arquêntero, onde na sua porção dorsal forma o cordamesoderma. O cordamesoderma induz o espessamento do ectoderma que irá formar a placa neural, que se funde numa linha mediana, formando o tubo neural, dando origem ao cordão nervoso dorsal. Na cabeça do embrião, o tubo neural torna-se grande e longo, sendo compartimentado em vesículas que delineiam as regiões do encéfalo (HILDEBRAND, 1995).

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC) que inclui o encéfalo e a medula espinhal, e sistema nervoso periférico (SNP) constituído por nervos cranianos e nervos espinhais que se conectam com estruturas somáticas (corpo). No SNP, os nervos sensitivos (aferentes) captam informações sobre o meio externo e o meio interno e transmitem essa informação ao SNC, que interpreta e integra esta informação de volta ao corpo através dos nervos motores (eferentes) do SNP (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2005).

Os nervos periféricos são cordões esbranquiçados subdivididos em três componentes importantes: axônios, células de Schwann e tecido conjuntivo (GRANT; GOODKIN; KLIOT, et al., 1999). Os axônios dos nervos periféricos são agrupados em feixes paralelos, conhecidos como fascículos, revestidos por bainhas de tecido conjuntivo frouxo, que fornece suporte à regeneração axonal. Cada nervo periférico é composto por fibras nervosas, camadas de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (FREDERICKS, 1996; THOMAS et al., 1997), podendo ser formado por um ou vários fascículos, todos envoltos por uma bainha mais externa de tecido conjuntivo denominada de epineuro, que serve de amortecedor durante os movimentos do

nervo, protegendo os fascículos de traumas externos, além de manter os suplementos de oxigênio através dos vasos epineurais. Tanto o epineuro quanto as bainhas mais internas, denominadas de perineuro e epineuro, são unidas entre si por meio de trabéculas conjuntivas, que também se unem aos tecidos vizinhos.(FLETCHER, 1998).

A unidade funcional do nervo periférico é o neurônio, constituído por um corpo celular circundado por células de suporte, as chamadas células de Schwann, equivalente aos oligodendrócitos do Sistema Nervoso Central (VEAS, 2009) e um axônio, constituinte interno de cada fibra nervosa, que pode estar recoberto por uma bainha lipídica, denominada bainha de mielina, ou pode haver a ausência desta (LANDON; HALL, 1976; PETERS et al., 1976). Os axônios das fibras mielínicas são cobertos pela bainha de mielina formada por muitas camadas compactas da membrana plasmática das células de Schwann, interrompida somente entre as células de Schwann e os nódulos de Ranvier, que juntos isola e protegem o axônio, além de aumentar a velocidade de condução dos impulsos nervosos (ILHA, 2007).

As fibras amielínicas também são envolvidas pelas células de Schwann, porém sem formar bainha de mielina. A proporção de fibras amielínicas para mielínicas no tronco nervoso periférico varia com a função do nervo, sendo na sua maioria, cerca de 75% amielínicas (FREDERICKS, 1996).

Os nervos conduzem os impulsos nervosos do SNC para a periferia (impulsos eferentes) e da periferia para o SNC (impulsos aferentes). Levando em consideração a velocidade de condução, os nervos são classificados em três grupos principais, A, B e C, que correspondem às fibras de grande, médio e pequeno calibre. As fibras A são ricamente mielinizadas, podendo ser divididas quanto a velocidade de condução, em alfa, beta e gama. As fibras B estão nas fibras pré ganglionares e as fibras C estão nas fibras pós ganglionares que são responsáveis por impulsos dolorosos (MACHADO, 1996).

2.2 LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

O sistema nervoso periférico já descrito anteriormente é toda região nervosa situada fora do sistema nervoso central segundo Machado (1993). Sua unidade funcional, o nervo periférico, possui um limite de distensão, sem que sofra danos na sua estrutura física, porém,

quando ocorre lesão, a consequência é a perda ou diminuição da sensibilidade e/ou motricidade no território inervado pelo nervo lesionado (WEINSTEIN; HERRING, 1992).

A classificação das lesões nervosas periféricas proposta por Seddon (1975) é baseada no grau de ruptura das estruturas internas do nervo periférico, que está relacionada com o prognóstico da recuperação, sendo descritas como neuropraxia, axôtiotmese e neurotme. A

A neuropraxia é uma lesão nervosa branda na bainha de mielina, na qual existe um bloqueio localizado da condução do impulso nervoso. O axônio não perde a sua continuidade, ocorrendo uma recuperação rápida e completa em poucos dias ou semanas. Segundo O'Sullivan e Schmitz (1993) trata-se de bloqueio local, interrompendo ou retardando a condução nervosa através de um ponto específico, sendo normal a condução acima e abaixo da lesão. A axôtiotmese é uma lesão mais grave, na qual os danos promovem uma ruptura da continuidade do axônio. O tempo de recuperação neste tipo de lesão é maior quando comparado a neuropraxia. Segundo O'Sullivan e Schmitz (1993) o tubo neural está intacto, porém o axônio está lesado. O prognóstico de recuperação funcional é bom, desde que seja mantida a continuidade do tecido conjuntivo de suporte e a integridade das células de Schwann da membrana basal. A neurotme é o tipo de lesão nervosa periférica mais grave. Ocorre a transecção total do nervo, levando a interrupção da transmissão do impulso nervoso. A recuperação neste tipo de lesão não ocorre espontaneamente, sendo necessária a reconstituição cirúrgica (ENDO, 2002).

Uma lesão por esmagamento induz uma alteração patológica em microvasos no endoneuro dos nervos periféricos, os quais induzem a diminuição tanto no fluxo sanguíneo do nervo, quanto na tensão de oxigênio endoneural, resultando em isquemia ou hipóxia endoneural (RYDEVIK; LUNDBORG; BAGGE, 1981), entretanto é uma modalidade útil para o estudo de regeneração dos nervos periféricos, pois ela mimetiza um tipo de axôtiotmese, na qual os danos são suficientes para romper o axônio, levando à degeneração walleriana distal, mas o prognóstico de recuperação funcional é bom, devido à preservação das estruturas de sustentação, como a célula satélite, a membrana basal e o tecido conectivo de suporte. A lesão nervosa periférica por esmagamento do nervo ciático de ratos tem sido o modelo mais adotado, pois apresenta a vantagem de não destruir completamente a estrutura morfológica do nervo, como ocorre com a secção e sutura (DE MEDINACELI et al, 1982).

Quando ocorre uma lesão no nervo, a degeneração do axônio distal ao local da lesão é designada como degeneração anterógrada (degeneração axonal ou walleriana). No SNP o

axônio se fragmenta em segmentos descontínuos em alguns dias. A bainha de mielina também se fragmenta e as células de Schwann migram para o local da lesão, removendo os fragmentos de mielina e axônios. Há também uma degeneração retrógrada que se estende apenas por alguns segmentos intermodais, em que após a degeneração axonal, resultando na destruição primária do axônio, seguida pela desmielinização e degeneração do corpo celular do neurônio (ROSS e PAWLINA, 2008). Sem contato com o axônio, as células de Schwann se alinham, formando um cordão celular chamado de bandas de Bungner, formando um ambiente favorável para o crescimento do axônio, além de fonte de fatores neurotóxicos. Brotos axonais surgem dos nódulos de Ravier na porção proximal a lesão, após 1 hora a injúria nervosa (KARTJE; SCHAWAB, 2006), estendendo-se entre a lâmina basal e as células de Schwann ou a bainha de mielina no segmento proximal, atravessam a fenda de tecido conjuntivo entre o coto proximal e distal, entrando no segmento distal. Os axônios do segmento distal crescem pela fixação da membrana de seus cones de crescimento a superfície interna da lâmina basal ou sobre a membrana plasmática das células de Schwann. As células de Schwann fornecem fatores que promovem a sobrevivência e estimulam o crescimento axonal, tais como fator de crescimento neural (NGF) e fator neurotrófico derivado do encéfalo (IDE, 1996).

2.3 RECUPERAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO APÓS LESÃO

Segundo Ide e colaboradores (1983) a preservação tanto das membranas quanto do perineuro, após uma lesão, é fundamental para a regeneração axonal, pois estes atuam como tubos orientando os neuritos em crescimento. De Medinaceli e Merle (1991) afirmam que, se a continuidade física entre os cotos persiste, como ocorre nas lesões por esmagamento, a probabilidade dos novos axônios crescerem através do local da lesão e dentro das bandas de Bungner ou tubos endoneurais é grande (FAWCETT; KEYNES, 1990).

O prognóstico de uma neuropatia depende do grau de lesão da estrutura nervosa. Animais acometidos por lesão em nervo periférico apresentam alterações funcionais sensitivas e motoras que devem ser adequadamente tratadas, possibilitando assim a diminuição de perdas funcionais e visando proporcionar uma melhor qualidade de vida aos mesmos (BELCHIOR et al., 2009). Animais acometidos por lesão em nervo periférico

apresentam alterações funcionais sensitivas e motoras que devem ser adequadamente tratadas, possibilitando assim a diminuição de perdas funcionais e visando proporcionar uma melhor qualidade de vida aos mesmos (ROCHKIND et al., 2007; REIS et al., 2009; BELCHIOR et al., 2009).

Embora os roedores apresentem uma taxa de regeneração axonal de 3-4 mm por dia, e a distância a ser regenerada seja menor que a do homem (TONGE; GOLDING, 1993), o que possibilita uma rápida reinervação das estruturas alvo, este modelo fornece importantes informações sobre o processo de diferenciação celular das fibras em regeneração e da recuperação funcional, além do nevo ciático de ratos promover uma fonte de estudos do tecido nervoso periférico em mamíferos, demonstrando detalhes celulares indistinguíveis dos nervos humanos (MACKINNON et al., 2005).

Para verificar uma possível regeneração nervosa periférica, são avaliados a densidade de axônios e o diâmetro da bainha de mielina entre os grupos com o intuito de comparar essas estruturas, uma vez que em nervos periféricos normais, os axônios são regularmente arranjados e de diâmetros similares, além de possuir uma bainha de mielina densa e sem deterioração (COSTA et al., 2006).

Oliveira et al (2001) estudou a correlação morfofuncional da regeneração do nervo ciático de ratos submetidos ao esmagamento com cargas controladas de três magnitudes (100g, 500g e 15.000g), demonstrando que as alterações morfológicas produzidas foram diretamente proporcionais à magnitude da carga aplicada e a recuperação funcional foi diretamente proporcional aos índices morfométricos de regeneração e indiretamente proporcional aos danos produzidos pelo esmagamento.

A recuperação morfológica e funcional após uma lesão nervosa raramente é completa e perfeita, apesar da aplicação de técnicas modernas e sofisticadas de tratamento. Inúmeros fatores podem influenciar a regeneração da fibra nervosa lesada, tais como a idade do paciente, o tipo de trauma, a localização da lesão, o tempo de desnervação, o tipo e o diâmetro das fibras nervosas acometidas, o método empregado para a reparação nervosa além de outras variáveis individuais (MENDONÇA et al., 2003).

2.4 O USO FITOTERÁPICOS COMO TERAPIA ALTERNATIVA NA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Planta medicinal é toda espécie vegetal que tenha um valor de cura ou que seja empregada na prevenção e tratamento de distúrbios ou doenças de homens e animais (AMOROZO; GELY, 1988).

Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) de ervas medicinais, obtidas a partir de uma ou mais plantas, que podem ser utilizadas para o tratamento de várias doenças. Usualmente, as substâncias ativas responsáveis por seu efeito farmacológico são desconhecidas. Dentre as inúmeras vantagens dos fitoterápicos estão seu largo uso terapêutico, seu baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda (CALIXTO, 2000).

O uso de plantas medicinais é uma prática milenar e bastante utilizada pelo homem em todo o mundo como alternativa terapêutica para o tratamento de diversas enfermidades. No Brasil, onde há uma grande diversidade de espécies vegetais com propriedades terapêuticas, os fitoterápicos ganham cada vez mais espaço no tratamento veterinário, que servem de protótipo para tratamentos inovadores em centros de pesquisa em todo o país.

Thiagarajane colaboradores em 2012, investigaram o potencial benéfico do extrato etanólico das folhas da *Butea monosperma* na contração crônica do nervo ciático em ratos, resultando em mudanças histopatológicas, bioquímicas e comportamentais, comprovando um potencial anti-oxidante e neuroprotetor desta espécie.

Wattanathorn e colaboradores em 2012 utilizaram a *Phyllanthus amarus*, conhecida como “quebra pedra” para avaliar a recuperação do nervo ciático em ratos após a lesão por esmagamento, demonstrando uma recuperação da função do nervo ciático através da densidade axonal aumentada, indicando que esta espécie tem o potencial para ser um agente neuroprotetor na reparação de lesão nervosa periférica.

Tehranipour e Erfani em 2012 testaram o extrato hidroalcoólico da *Curcuma longa* na regeneração de neurônios e neuroglia após esmagamento do nervo ciático em ratos diabéticos. Quatro semanas de tratamento resultou em um aumento significativo no número de neurônios intactos, mostrando que a *Curcuma longa* tem efeito protetor sobre os neurônios e neuroglia após a lesão do nervo ciático, mesmo em animais diabéticos.

Ding; Cheng; Gu (2008) utilizaram o extrato aquoso da raiz da *Achyranthes bidentata* para recuperação de lesão em nervo ciático em coelhos, usando uma combinação de avaliação eletrofisiológica e aspecto histológico, sugerindo uma aceleração na regeneração do nervo periférico de uma forma dependente da dose. O extrato etanólico da mesma planta foi utilizado por Muthuraman e Singh em 2011 comprovando um efeito benéfico através de testes de hiperalgesia mecânica e térmica, indicando uma ação anti-oxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora na contração nervosa periférica em ratos.

Estes mesmo autores (MUTHURAMAN; SINGH, 2012) dando prosseguimento a linha de pesquisa, utilizaram o extrato hidroalcoólico da *Acorus calamus* na contração no nervo ciático, reduzindo comportamentos ligados a dor neuropática, atenuando o limiar nociceptivo de hiperalgesia térmica e alodinia, que também demonstrou ação anti-oxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora deste extrato hidroalcoólico.

Jang; Cho; Choi(2012) fizeram o uso da injeção intra-peritoneal do extrato de ginkgo biloba na lesão nervosa periférica em ratos, relatando um efeito neuroprotetor e promovendo uma regeneração nervosa periférica no nervo facial.

2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A *Caesalpinia ferrea*

A *Caesalpinia ferrea* é uma árvore de grande porte, com tronco liso e cerne duro, podendo chegar a 15 m de altura. Suas folhas são bipenadas com folíolos oblongos, ovalados, suas flores diclamídeas, hermafroditas. O nome do gênero *Caesalpinia* descrito por Carl Linnaeus é uma homenagem a Andrea Caesalpino, botânico italiano de acordo com Di Stasi (2002).

A família Caesalpinieae inclui diversos gêneros, dentre eles o gênero *Caesalpinia*, com inúmeras espécies de interesse medicinais, destacando espécies como: *C. bonduc*, *C. bonducella*, *C. sapane*, *C. pulcherrimae* a *Caesalpinia ferrea*. Esta última, denominada na região amazônica como jucá é mais conhecida em todo o Brasil como pau-ferro ou pau-ferro verdadeiro, além de receber denominações indígenas como ibirá-obi, imiraitá, muirá-obi e muiré-itá (LORENZI, 1998). As folhas e frutos, com base no que descreve Di Stasi (2002), são utilizados para tratar inflamações do fígado e problemas respiratórios, a casca é usada

internamente como antidesentérico, contra asma e bronquite. A infusão conjunta da raspa da casca com folhas de manga é útil como antigripal e antitussígeno, a vagem crua é útil contra inflamações do fígado e baço, problemas renais e pulmonares.

Deste os trabalhos testando atividades medicinais da *Caesalpineia ferrea* citam-se, por exemplo, aqueles desenvolvidos por: Carvalho et al (1996), avaliando atividades anti-inflamatória e analgésica do extrato aquoso, onde relatam a diminuição do edema de membro e as contorções abdominais em camundongos; Oliveira (2008) utilizando pomada da casca com uso tópico em feridas cutâneas induzidas em caprinos, testando o efeito cicatrizante; Sampaio (2009), estudando a atividade antimicrobiana *in vitro* de patógenos na cavidade oral em modelos de biofilme confeccionados a base de extrato etanólico do juca; Tomaz (2010), realizando teste *in vitro* com extrato etanólico do juca para inibir o crescimento de bactérias causadoras da mastite bovina e, finalmente, Lima e colaboradores (2011) demonstrando o potencial anti-inflamatório do extrato etanólico deste vegetal em camundongos após indução de peritonite e edema de orelha, além do potencial analgésico, com base em testes de indução de contorção abdominal permitindo a avaliação de respostas antinociceptivos.

2.6 ESTUDO QUÍMICO DA *Caesalpineia ferrea*

As atividades fitoterapêuticas da *Caesalpineia ferrea* vem despertando o interesse de pesquisadores para a identificação dos seus constituintes químicos básicos, como forma de identificar quais substâncias possuem atividades farmacológicas, como por exemplo, os polissacarídeos vegetais.

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, sendo os principais constituintes químicos das plantas por formar a parede celular que é o suporte estrutural das células vegetais (REID, 1997), possuindo funções relacionadas ao crescimento, morfologia, desenvolvimento, adesão, expansão, porosidade, sinalização e respostas de defesa contra patógenos (PEREIRA, 2011). Abbas e Lichtman (2005) se referem aos polissacarídeos como modificadores exógenos de respostas biológicas, uma vez que atuam como moduladores da inflamação, imunidade e hematopoiese, atuando ou suprimindo a

resposta de células do sistema imune (macrófagos, monocitos, neutrófilos, células “Natural Killer”, eosinófilos e linfócitos).

Os extratos polissacarídicos da vagem da *Caesalpineia ferrea* apresentam atividade anti-edematogênica induzido por diferentes estímulos de natureza osmótica (dextrana) e celular (carragenina). Da mesma forma, as frações polissacarídicas de *Caesalpineia ferrea* apresentam um eficiente efeito inibitório em modelo edema de membro e peritonite induzidas por diferentes agentes inflamatórios. Polissacarídeo isolado parece atuar em vários pontos do processo inflamatório podendo estar envolvidos no antagonismo de alguns mediadores, ou ainda, neutralizando a liberação destes por células, impedindo os eventos vasculares e celulares da inflamação, fornecendo subsídios necessários para comprovar cientificamente a atividade anti-inflamatória dessas partes das plantas, apoiando o seu uso popular no tratamento de diversas doenças inflamatórias (PEREIRA, 2011).

O potencial antinociceptivo e/ou analgésico de polissacarídeos isolados de plantas superiores é pouco explorado comparado aos estudos investigando suas ações imunomoduladoras, tendo poucos relatos desses efeitos. Em animais experimentais é possível avaliar o componente inflamatório em modelos de nocicepção química, como por exemplo, nos modelos de dor visceral induzida pela administração intraperitoneal de ácido acético (NASCIMENTO, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do extrato aquoso (EACF) e hidroalcoólico (EHCF) da vargem da *Caesalpineia ferrea* na neuropatia traumática experimental induzida pelo esmagamento do nervo ciático;

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos do comportamento espontâneo e auto-dirigidos relativos à motricidade no tratamento da neuropatia crônica com o uso diário via oral do EACF e EHCF;
- b) Verificar possíveis efeitos regenerativos dos EACF e EHCF no tratamento crônico de neuropatia traumática induzida através da morfologia dos axônios em coloração histológica com hematoxilina e eosina;
- c) Realizar o modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético a 0,6% administrados via intraperitoneal, 1 hora após a administração via oral do EACF e EHCF;
- d) registrar efeitos analgésico dos EACF e EHCF no teste de hiperalgesia térmica induzida por carragenina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O presente trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia e de Morfofisiologia Animal Aplicada do Departamento de Ciências Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA, autorizado pela Comissão de Ética do Uso de Animais da mesma instituição de ensino superior com o parecer de N° 03/2013 e processo de N° 23091000364/46.

4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As vagens da *Caesalpineia ferrea* foram coletadas no mês de maio de 2013 no antigo Parque Zoobotânico da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O material vegetal foi registrado no Herbário da mesma instituição de ensino superior com a exsicata de N° 14062.

4.3 PRODUÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DA *Caesalpineia ferrea*

As vagens foram trituradas em multiprocessador e misturadas a água destilada na proporção de 50g de vagem para 400 ml de água destilada e 50 ml de etanol, e imerso em banho-maria a temperatura 70 °C durante 60 minutos. Após este período, o material foi filtrado e armazenado a 4°C.

4.4 PRODUÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA *Caesalpineia ferrea*

Para a obtenção do extrato aquoso da *Caesalpineia ferrea*, as vagens foram trituradas em multiprocessador e misturadas à água destilada na proporção de 50g da vagem para 500ml de água destilada. O material foi imerso em banho-maria a temperatura 70 °C durante 1 hora. Após este período, os extratos foram filtrados e armazenados a 4 °C.

Para definir a miligrama e o volume do extrato administrados no tratamento diário dos animais, foram confeccionados com papel alumínio, 20 pequenos recipientes em formato de “plaquinhas”. Previamente, cada recipiente foi pesado em balança de precisão e em seguida, foi adicionando 1 ml do extrato aquoso da *Caesalpineia ferrea* (EACF) em cada uma das 10 plaquinhas de alumínio. Seguindo esse modelo, também foi estimada a miligrama do extrato hidroalcoólico (EHCA). Em seguida, as plaquinhas foram alocadas em estufa de secagem a 40 °C durante 24 horas. Após este período, os recipientes foram novamente pesados e assim, pôde estimar 300 mgde cada extrato.

4.5 ANIMAIS

Foram utilizados 82 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, pesando entre 250 e 300 g provenientes do biotério da UFERSA. Os animais foram alocados em caixas retangulares de plástico de (30cmx10cm), sendo três animais por caixa e acondicionados em temperatura climatizada de 26 a 28°C e ciclo claro e escuro de 12/12 horas. Destes animais, 40 destinaram-se a etapa de indução da neuropatia por constrição crônica do nervo ciático – CCNC e os 42 restantes destinados a etapa de testes de indução de dor periférica. Os animais foram submetidos a condições únicas de manejo, alimentados com ração comercial própria para ratos e água *ad libitum*.

4.6 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Os 40 animais destinados a CCNC foram divididos em quatro grupos de 10 animais, sendo Grupo - Sham (pseudo-operado tratado com solução salina); Grupo - Neuropático salina (controle tratado com solução salina); Grupo - EACF (neuropático tratado com 300 mg de EACF) e o Grupo - EHCF (neuropático tratado com 300 mg de EHCF). Os Grupos salina, EACF e EHCF foram submetidos à neuropatia experimental através do esmagamento do nervo ciático (Tabela 1). Todos os grupos tiveram seu tratamento via oral específico realizado duas vezes por dia ao longo de quatro semanas seguidas após a indução da neuropatia traumática. Já os demais animais foram divididos em três grupos de 14 indivíduos para realização de testes de dor periférica (contorção abdominal por ácido acético, hiperalgesia térmica)(Tabela 2).

Tabela 1. Distribuição dos grupos de animais. Tratamento diário dos animais no decorrer de três semanas de indução neuropática por CCNC.

Grupo	Tratamento diário
Sham	Solução Salina
Neuropático	Solução Salina
Neuropático	300 mg/Kg EACF
Neuropático	300 mg/Kg EHCF

Tabela 2. Distribuição dos grupos de animais. Tratamento único de dor induzida por ácido acético e carragenina.

MODELO	Nº DE ANIMAIS	TRATAMENTO
Contorção Abdominal	07	SALINA
	07	EACF
	07	EHCF
Hiperalgesia (Carragenina)	07	SALINA
	07	EACF
	07	EHCF

4.7 MODELO DE INDUÇÃO DE NEUROPATIA POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO

Para induzir uma neuropatia por constrição crônica do nervo ciático, foi realizado um procedimento cirúrgico baseado no modelo criado por Bennett e Xie (1988), modificado por Seltzer, Dubner e Shir (1990), que consiste na constrição crônica unilateral do nervo ciático utilizando-se ligaduras frouxas em torno do terço médio do nervo. Os animais dos Grupos 2, 3 e 4 foram submetidos a anestesia dissociativa com 50mg/Kg de cetamina 5% e 10mg/Kg de xilazina 2% por via intraperitoneal. Inicialmente o segmento do nervo ciático foi exposto a partir de uma incisão cutânea longitudinal retilínea de 1cm de comprimento na face lateral da coxa, numa extensão desde o trocânter maior até próximo ao joelho. Após divulsionamento dos músculos, o segmento do nervo ciático direito foi exposto e esmagado a 1cm da trifurcação ciática e mantido por 30 segundos utilizando-se uma pinça microcirúrgica. Em seguida o segmento do nervo lesionado foi recolocado no seu local de origem, sem traçamentos ou outros danos, e as incisões da pele foram suturadas com fio mononylon 5-0. Sobre linha de incisão foi aplicado por via tópica, clorexidine solução para prevenir possíveis infecções de pele e em seguida os animais foram recolocados em caixas limpas para recuperação cirúrgica.

4.8 OBSERVAÇÃO DE COMPORTAMENTOS ESPONTÂNEOS E INDUZIDOS DE DOR

Para estudo prévio do trauma e regeneração neural periférica e pós traumática, todos os animais tiveram seus comportamentos espontâneos registrados desde a semana anterior a CCNC e ao longo de três semanas consecutivas, após a indução neuropática.

Na semana anterior ao procedimento cirúrgico de indução neuropática, até a terceira semana seguinte, cada animal teve seus comportamentos espontâneos registrados e quantificados durante vinte minutos, semanalmente, através de um programa de computador LabRat®, baseado no software COMPORTA® de quantificação de comportamentos (DE CASTRO-COSTA et al., 1981).

Neste modelo é possível a observação de comportamentos considerados como manifestação de dor, de mobilidade ou expressão fisiológica. Para realizar as observações comportamentais cada rato foi colocado em um observatório de madeira (100cm x 50cm x 50cm) com frente de vidro e no fundo uma cama de serragem de madeira de 2 cm de espessura, em sala silenciosa e iluminação suave. Após 60 minutos de tratamento de cada grupo e em seguida de um período de adaptação de cinco minutos, as observações iniciavam. Durante vinte minutos consecutivos, os comportamentos de cada rato foram registrados e quantificados através de um programa de computador - Programa LabRat® de quantificação de comportamentos.

Os comportamentos observados foram coçar-se, morder-se, lambear-se, empinar-se, escalar, andar, limpar-se, cheirar, descansar, comer e congelar-se. Os comportamentos andar, empinar-se e escalar são considerados de exploração e de motricidade elevada. O comportamento de coçar-se foi observado à direita e à esquerda, o mesmo para o morder-se, tendo em vista a unilateralidade da lesão cirúrgica.

4.9 TESTE DE SENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO

Para verificação de alodinia térmica ao frio, sinal clínico característico na dor neuropática, utilizou o modelo descrito por Flatters e Bennett(2004), um teste que faz o uso da propriedade volátil da acetona para induzir a sensação de 10°C no animal descrito por Choi e colaboradores (1994). Os animais foram colocados em gaiolas suspensas com um piso fenestrado composto por malha metálica, que podia ser observado a superfície ventral do membro do animal através de um espelho colocado em inclinação de 45° com a superfície, abaixo da gaiola. Após um período de aclimação de 5 minutos, uma alíquota de 0,05 ml de acetona era lançada sob a superfície ventral através do piso fenestrado, em seguida iniciava um período de observação de 20s, no qual o animal poderia ou não apresentar comportamentos relacionados à dor. Caso o animal não mostrasse reação, a observação do membro se encerrava no fim desse tempo inicial e o observador seguia para o membro contralateral ou para outro animal. Os comportamentos foram avaliados de acordo com os escores: 0: ausência de qualquer comportamento doloroso; 1: retirada rápida da membro e/ou

com tremor desta; 2: retirada com sustentação prolongada da membro; 3: o animal lambia a face ventral da membro.

4.10 TESTES DE REFLEXOS

Foram feitos testes de reflexo no membro pélvico direito e esquerdo de todos os animais, com três repetições para cada teste, desde a semana anterior a cirurgia de indução de CCNC até a terceira semana pós-cirúrgica, baseados no modelo de Temporin e colaboradores (2008). Estes testes tinham como objetivo a recuperação da função motora e sensitiva do membro, a partir do desempenho de cada reflexo.

No teste do reflexo extensor do membro pélvico direito, o manipulador empurrava cranialmente com seu dedo indicador na região plantar do animal. Em seguida estimava registrava os reflexos de extensão. No teste de reflexo flexor, o manipulador empurrava dorsalmente com seu dedo indicador o membro pélvico direito do animal, logo em seguida, registrava o reflexo flexor. No reflexo de retirada lateral, o manipulador fazia o uso de uma pinça anatômica oftálmica para pinçar lateralmente o quinto dedo no membro pélvico direito de cada animal. No reflexo de retirada interdigital, o manipulador fazia o uso da mesma pinça citada anteriormente, pinçando a interdigital dos dedos um e dois do membro pélvico direito de cada animal. No final da indução de cada um destes quatro testes, eram feitos registros baseados nos seguintes escores: 0: sem reflexo; 1: baixo reflexo; 2: reflexo mediano; 3: alto reflexo.

4.11 TESTE DE SENSIBILIDADE TÉRMICA (BANHO-MARIA)

Para o estudo da hiperalgesia térmica ao calor, utilizamos o modelo descrito por Attal et al (1990). Em nosso método de avaliação da sensação térmica quente, a membro dos animais era imerso em um banho-maria isolado termicamente e com temperatura controlada de 46°C. O membro pélvico do animal era submergido até a altura do osso calcâneo

(tornozelo) e em seguida aguardava-se uma resposta do animal até no máximo 20 segundos, com duas repetições, calculando a duração de tempo de permanência do membro, registrando em cronômetro o tempo de latência do membro no banho maria.

Os animais foram avaliados na semana anterior a CCNC e nas quatro semanas posteriores a evolução da neuropatia.

4.12 MODELO DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.

As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal e extensão dos membros pélvicos. O modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético permite avaliar a nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto a nível central quanto periférico (COLLIER et al., 1968), baseado na metodologia de Pietrovski (2004). Foram utilizados 40 ratos machos, divididos em três grupos com 10 animais cada. Dois grupos foram pré-tratados com 300 mg de EACF e EHCF, respectivamente, por via oral, 60 minutos antes da injeção de ácido acético 0,6% diluído em solução salina 0,15M. Um terceiro grupo recebeu solução salina no mesmo volume dos extratos utilizados. Após a injeção de ácido acético o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 minutos. A atividade antinociceptiva foi determinada com base na inibição do número de contorções abdominais dos animais pré tratados com a amostra dos EACF e EHCF, comparando com o número de contorções abdominais do grupo controle tratado com solução salina.

4.13 MODELO DE HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA POR CARRAGENINA

Os animais foram tratados 60 minutos antes da indução do edema desenvolvido pela aplicação de carragenina administrada por via subcutânea no membro pélvico direito de cada animal, uma dose de 100µg/membro, em volume de 10µL. Em nosso método de avaliação da sensação térmica quente, a membro dos animais era colocada em um banho-maria isolado termicamente e com temperatura controlada de 46°C. O membro posterior do animal era

submergido na água do pequeno recipiente até o calcâneo e se aguardava alguma resposta do animal até no máximo 20 segundos quando era retirado o recipiente. As imersões do membro na água eram feitas com intervalos de 5 minutos, com duas repetições, a partir das quais era calculada a duração de tempo de permanência do membro na água até a retirada da mesma pelo animal, registrando em cronômetro o Tempo de Latência de Retirada do membro (TLR), medida em 20 segundos, em três repetições. O estudo de hiperalgesia térmica foi avaliado na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª horas após a injeção da carragenina, utilizando-se de um banho-maria.

4.14 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL PARA HISTOLOGIA

Para a realização da coleta do nervo ciático de todos os animais na quarta semana de experimento, sob anestesia dissociativa com 50 mg/Kg de cetamina 5% e 10 mg/Kg de xilazina 2% por via intraperitoneal, os animais foram eutanasiados e exsanguinados. Em seguida, o nervo ciático do membro pélvico direito foi exposto e seccionado 5 mm distal ao esmagamento, próximo da trifurcação ciática. Depois da coleta, os segmentos dos nervos eram submetidos a protocolos específicos de tratamento para Microscopia de Luz.

4.15 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ

O segmento proximal, até 5 mm distal a ligadura no nervo ciático foi imerso em solução aquosa de paraformaldeído a 4% tamponado com tampão fosfato de sódio, pH 7,4, 0,1 M, para fixação. Em seguida, estes segmentos foram desidratados e diafinizados em uma série de álcoois e xilóis, respectivamente, e finalmente incluídos em paraplast para formação dos blocos e obtenção dos cortes histológicos e corados pelo método de coloração por hematoxilina eosina. Finalizada a coloração, foi realizada a montagem definitiva das lâminas. Para a avaliação qualitativa dos axônios, as lâminas foram fotografadas através de microscopia de luz, com um microscópio Olympus modelo BX51, sendo as imagens

capturadas através de câmera digital Olympus DP72 acoplada ao microscópio e enviadas ao computa

4.16 ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão avaliados pelo programa estatístico SigmaPlot for Windows (SigmaPlot; Systat Software Inc) versão 12.0. Após avaliação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância por Levene, diferença estatística entre semanas dentro de cada grupo e entre grupos experimentais para cada semana foram obtida respectivamente por Análise de variância (One Way ANOVA RM) para medidas repetidas e Análise de variância (One Way ANOVA) seguida por Tukey, quando respeitado o pressuposto paramétrico. Dados não paramétricos foram testados por Friedman e Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS NEUROPÁTICOS INDUZIDOS POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO

5.1.1 Comportamentos espontâneos que expressam motricidade (andar e empinar)

Nos comportamentos que expressam motricidade (andar e empinar), observa-se na Tabela 3 que o comportamento andar não foi influenciado pela indução neuropática, nem pelos tratamentos. É possível observar que na média de execução destes comportamentos, não houve diferença estatística entre todos os grupos em cada semana e no decorrer das três semanas pós cirúrgica. Em relação ao comportamento de empinar (Tabela 4), a diferença estatística da média de execução deste comportamento observada entre os grupos neuropáticos e o grupo *sham*, indicam que ocorreu o processo neuropático. O fato de não observar-se diferença estatística entre os grupos tratados com EACF e EHCF em relação ao grupo tratado com solução salina, são sugestivos de que não houve efeito neuroprotetor dos extratos nos tratamentos realizados após a indução da neuropatia.

Tabela 3 – Comportamento espontâneo de andar observado em ratos submetidos a CCNC.

Variáveis	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Sham	91,11 ± 67,70 ^{aA}	71,89 ± 52,54 ^{abA}	43,51 ± 41,87 ^{bA}	83,58 ± 71,96 ^{abA}
Salina	80,89 ± 54,38 ^{aA}	67,85 ± 48,09 ^{aA}	68,17 ± 55,34 ^{aA}	38,70 ± 12,71 ^{aA}
EACF	72,55 ± 27,89 ^{aA}	43,20 ± 41,94 ^{aA}	65,25 ± 22,82 ^{aA}	63,97 ± 49,11 ^{aA}
EHCF	71,56 ± 43,92 ^{aA}	31,86 ± 20,57 ^{aA}	84,17 ± 66,53 ^{aA}	81,41 ± 63,51 ^{aA}

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0.05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

Tabela 4 – Comportamento espontâneo de empinar observado em ratos submetidos a CCNC.

variáveis	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Sham	135,76 ± 75,91 ^{aAB}	131,64 ± 65,54 ^{aA}	123,83 ± 76,01 ^{aA}	154,49 ± 85,98 ^{aA}
Salina	90,81 ± 74,57 ^{aB}	58,31 ± 22,71 ^{aB}	35,34 ± 6,14 ^{aB}	69,67 ± 15,03 ^{aB}
EACF	187,92 ± 36,85 ^{aA}	104,56 ± 43,45 ^{bA}	51,11 ± 30,92 ^{bAB}	88,63 ± 49,31 ^{bB}
EHCF	69,88 ± 55,67 ^{aAB}	58,56 ± 10,37 ^{aAB}	52,78 ± 55,99 ^{aAB}	69,16 ± 56,14 ^{aB}

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0.05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

5.1.2 Comportamento espontâneo de coçar

O comportamento de coçar na neuropatia periférica é indicativo de manifestação de dor em animais induzidos por CCNC. O registro do comportamento de coçar no membro pélvico direito foi iniciado na semana que antecedia sua indução de CCNC (semana 0) e foi mantido por três semanas seguintes a esta. Os resultados mostrados na Tabela 5 indicam que os animais apresentaram o mesmo padrão de comportamento de coçar, independente do tipo de tratamento utilizado em cada grupo, mesmo quando comparado com os dados da semana zero. Na semana 1 verificou-se que os animais tratados com o EACF diferiram em relação ao grupo *sham* e ao EHCF, apresentando um maior tempo de execução do comportamento de coçar, indicativo de dor crônica, sendo significativamente mais executado (p<0,05), o que pode sugerir que o uso do EACF não demonstrou um efeito analgésico nesta semana. Na semana 3, o grupo de animais tratados com o EHCF seguem o mesmo padrão de execução do comportamento coçar do grupo tratado com o EHCF, sugerindo que não houve efeito analgésico dos extratos na neuropatia ciática crônica.

Tabela 5 – Comportamento espontâneo de coçar observado em ratos submetidos a CCNC.

Variáveis	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
<i>Sham</i>	25,78 ± 15,92 ^{aA}	20,89 ± 11,36 ^{aB}	33,90 ± 25,05 ^{aB}	22,65 ± 27,79 ^{aB}
Salina	34,38 ± 14,37 ^{aA}	94,72 ± 87,67 ^{aAB}	98,46 ± 57,46 ^{aA}	85,84 ± 37,48 ^{aB}
EACF	48,52 ± 14,75 ^{aA}	190,01 ± 92,73 ^{aA}	143,96 ± 114,85 ^{aA}	157,25 ± 52,35 ^{aA}
EHCF	63,72 ± 34,29 ^{aA}	62,93 ± 37,04 ^{aB}	78,31 ± 80,01 ^{aAB}	146,32 ± 109,37 ^{aAB}

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0.05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

5.1.3 Comportamento induzido de hiperalgesia térmica ao frio

No comportamento induzido de hiperalgesia térmica ao frio, observa-se que na semana zero os animais neuropáticos apresentaram o mesmo comportamento de reação ao frio, quando comparados com os do grupo *sham*, sugerindo que os animais neuropáticos foram menos responsivos a indução de hiperalgesia térmica com acetona. Na semana 1 e 2 verificou-se que os animais neuropáticos modificaram o padrão de comportamento em relação ao grupo *sham*, que diferiram estatisticamente (p<0,05), demonstrando uma rápida reação a hiperalgesia térmica ao frio conforme pode ser observado na Tabela 6. No entanto, na semana 3 o grupo EHCF e o *sham* mostraram uma diferença significativa entre o grupo tratado com o EACF que No teste que avalia o comportamento de hiperalgesia térmica ao calor produzido por banho-maria a uma temperatura de 46°C, os grupos neuropáticos apresentam diferenças estatísticas significativas quando comparados com o grupo *sham* na semana 1. Já o grupo tratado com EACF diferiu significativamente do grupo salina e EHCF na semana 3 (Tabela 7).

Tabela 6 – Comportamento induzido de hiperalgesia térmica ao frio (acetona) observado em ratos submetidos a CCNC.

Variáveis	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
<i>Sham</i>	2,62 ± 0,91 ^{aA}	1,12 ± 1,12 ^{bB}	1,5 ± 0,75 ^{abB}	1,37 ± 1,18 ^{abB}
Salina	2,12 ± 1,12 ^{bA}	4,12 ± 2,79 ^{aA}	4,62 ± 2,97 ^{aAB}	4,25 ± 2,76 ^{aAB}
EACF	2,25 ± 1,64 ^{bA}	4,87 ± 2,29 ^{aA}	6,12 ± 2,12 ^{aA}	4,57 ± 1,81 ^{aA}
EHCF	1,5 ± 1,51 ^{bA}	3,0 ± 1,51 ^{bA}	5,0 ± 0,92 ^{aA}	2,25 ± 1,98 ^{bB}

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0.05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

Tabela 7 – Comportamento induzido de hiperalgesia térmica ao calor (banho-maria) observado em ratos submetidos a CCNC.

Variáveis	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Sham	18,5 ± 2,77 ^{aA}	15,37 ± 4,03 ^{abA}	17,25 ± 5,20 ^{aA}	11,25 ± 6,20 ^{bAB}
Salina	15,75 ± 5,36 ^{abA}	11,37 ± 3,96 ^{bB}	12,62 ± 6,39 ^{abA}	17,50 ± 5,63 ^{aA}
EACF	20 ^{aA}	13,87 ± 6,10 ^{bAB}	13,12 ± 7,01 ^{bA}	9,14 ± 2,79 ^{bB}
EHCF	19,50 ± 1,41 ^{aA}	13,87 ± 6,64 ^{abAB}	12,75 ± 5,99 ^{bA}	7,12 ± 3,35 ^{cB}

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0.05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

5.2 EFEITOS DOS EACF E EHCF NOS COMPORTAMENTOS DE DOR INDUZIDA

5.2.1 Testes de reflexos

Em relação ao comportamento de reflexo foi avaliada a recuperação da função do nervo (regeneração) após a CCNC. No comportamento de reflexo extensor com base na Tabela 8 é possível afirmar a presença da neuropatia na semana 1, considerando as diferenças estatísticas observadas entre os animais tratados e o grupo *sham*. Na semana 3 os animais tratados com os extratos diferiram do grupo tratado com solução salina, mostrando um maior reflexo de extensão do membro pélvico neuropático, porém diferiram estatisticamente do grupo Sham, sendo possível observar que este grupo apresentou um maior escore de reflexo. Verificou-se também, com base na Tabela 9, que o comportamento induzido de reflexo flexor do membro neuropático pélvico foi mais desenvolvido na semana 2 nos animais tratados com os extratos, diferindo daqueles tratados com solução salina, desenvolvendo uma melhor resposta ao estímulo utilizado para promover o reflexo de flexão do membro, ao longo do período observado. Na semana 3, apenas o grupo tratado com EACF difere dos grupos salina e *sham*, o que pode representar a ausência da influência dos extratos na recuperação neuropática no final do experimento.

Tabela 8– Comportamento induzido de reflexo extensor observado em ratos submetidos a CCNC.

Variáveis	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
<i>Sham</i>	9,0aA	8,87 ± 0,35aA	8,62 ± 1,06aA	9,0aA
Salina	9,0aA	0,37 ± 1,06bB	0bC	2,25 ± 1,38bC
EACF	9,0aA	0cB	5,0 ± 1,54bB	7,0 ± 3,09bB
EHCF	9,0aA	0dB	4,48 ± 1,55cB	7,12 ± 2,74bB

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0.05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

Tabela 9 – Comportamento induzido de reflexo flexor observado em ratos submetidos a CCNC.

Variáveis	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
<i>Sham</i>	9,0aA	9,0aA	9,0aA	9,0aA
Salina	9,0aA	0bB	0bC	1,50 ± 1,60bC
EACF	9,0aA	0cB	2,57 ± 2,07bB	3,42 ± 3,20bB
EHCF	9,0aA	0cB	3,75 ± 2,12bB	5,62 ± 2,97bBC

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0.05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

Quanto aos comportamentos de dor induzida provocada por pinçamento da área interdigital e lateral da região plantar, em que se observava a retirada do membro, analisando-se a Tabela 10, verificou-se que nas semanas 1 e 2 os animais apresentaram comportamentos similares para a retirada do membro pélvico neuropático. Já em relação à semana 3 os animais tratados com os extratos modificaram o padrão de comportamento em relação ao grupo tratado com solução salina ($p<0,05$) por apresentar um maior reflexo de retirada do membro ao pinçar o interdigital. O fato dos animais tratados com os extratos não diferirem do grupo *sham* pode ser um indicativo da recuperação do reflexo após a indução neuropática. No teste de pinçar lateral, analisando-se a Tabela 11, percebe-se que o comportamento de retirada do membro não difere entre os grupos na semana 1. Já na semana 3, os animais tratados com os extratos tiveram uma diferença significativa em comparação aos animais do grupo tratado com solução salina, em contra partida, iguais estatisticamente ao grupo *sham*, o que sugere uma recuperação neuropática.

Tabela 10 – Comportamento induzido de pinçar interdigital observado em ratos submetidos a CCNC.

Variáveis	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Sham	7,12 ± 2,74aAB	8,25 ± 1,38aA	7,87 ± 1,55aA	7,78 ± 1,55aA
Salina	6,37 ± 2,50aB	3,37 ± 2,50abB	2,62 ± 2,97bB	4,50 ± 1,60abB
EACF	7,71 ± 1,60aAB	5,14 ± 1,46aB	5,14 ± 1,46aB	8,14 ± 1,46aA
EHCF	9,0aA	3,75 ± 2,12bB	5,62 ± 1,06abB	8,25 ± 2,12aA

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0.05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

Tabela 11 – Comportamento induzido de pinçar lateral observado em ratos submetidos a CCNC.

Variáveis	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Sham	7,50 ± 2,77aA	6,87 ± 2,79aA	7,50 ± 1,60aA	8,12 ± 1,35aA
Salina	7,12 ± 2,23aA	4,12 ± 2,23abA	3,0 ± 2,77bB	4,48 ± 1,55abB
EACF	8,57 ± 1,13aA	5,14 ± 1,46bA	6,0 abA	8,14 ± 1,46abA
EHCF	9,0 aA	3,75 ± 2,65cA	5,25 ± 2,12bcAB	8,25 ± 2,12aA

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha (P<0.05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

Nos comportamentos que expressam dor periférica, utilizando-se o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (dor visceral) e hiperalgesia térmica induzida por carragenina (dor inflamatória), constata-se, analisando a Tabela 12 e 13, respectivamente, que não houve diferenças significativas entre os grupos tratados com os extratos ou naqueles tratados com a solução salina, sugerindo que os extratos não possuem efeito analgésico agudo, pelo menos na dose utilizada.

Tabela 12 – Comportamento induzido de contorção abdominal por ácido acético.

Variáveis	Numero de contorções
Salina	22,42 ± 8,42A
EACF	11,57 ± 7,89A
EHCF	16,57 ± 10,48A

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

Tabela 13 – Comportamento induzido por carrageninano teste de hiperalgesia térmica.

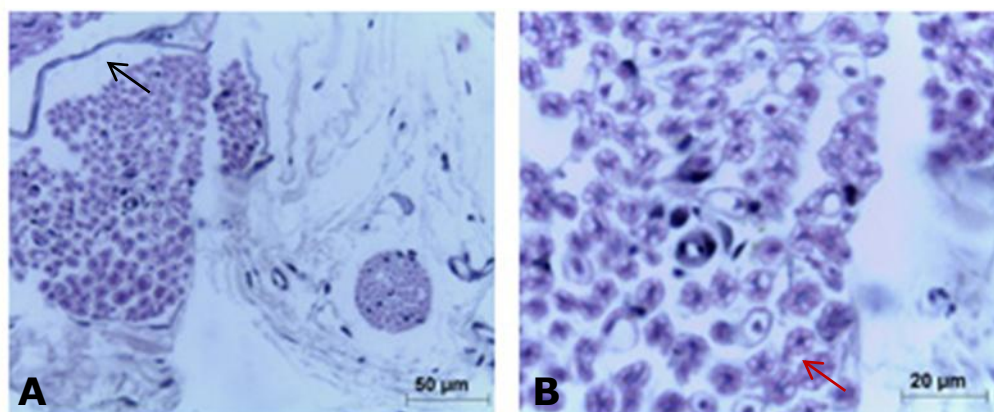
Variáveis	Tempo de retirada
Salina	12,83 ± 5,31A
Aquoso EACF	17,26 ± 4,76A
EHCF	16,89 ± 4,43A

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

5.2.2 Avaliação histológica dos nervos ciáticos apos a CCNC.

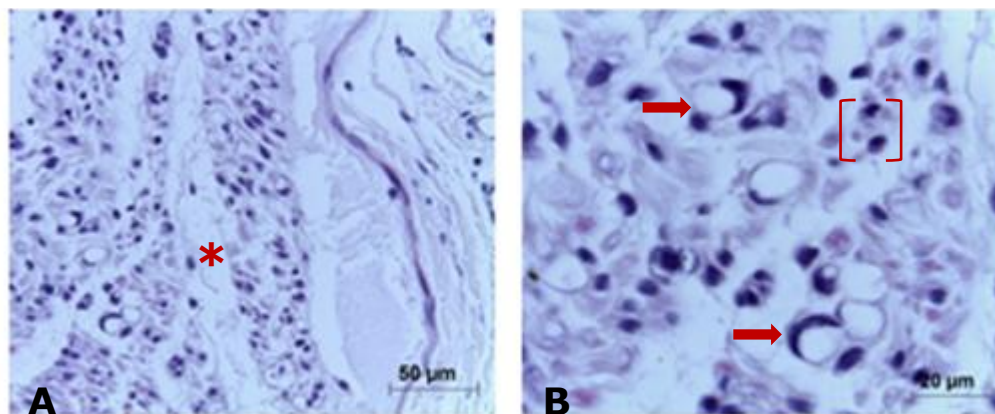
Com base nos resultados histológicos, o grupo *Sham*, verificou-se que os axônios mantiveram-se íntegros apresentando características de estruturas de axônios normais, de forma circular e com presença de bainha de mielina bem delimitada. Os axônios se apresentam próximos uns aos outros, com pouco espessamento entre eles, sugerindo certa densidade axonal. Sobre de células de Schwann, estas se encontram ausentes nos cortes histológicos dos animais do grupo *Sham*(Figura 1).

Figura 1 Corte transversal de nervo ciático de ratos do grupo Sham. Em A tem-se uma visão panorâmica de corte histológico do nervo ciático. A seta preta identifica a presença do perineuro. Em B verifica-se presença de muitos axônios íntegros envoltos por uma bainha de mielina íntegra. Observar a presença de axônio íntegro (seta vermelha). Paraplast, 5 μ m, H-E.



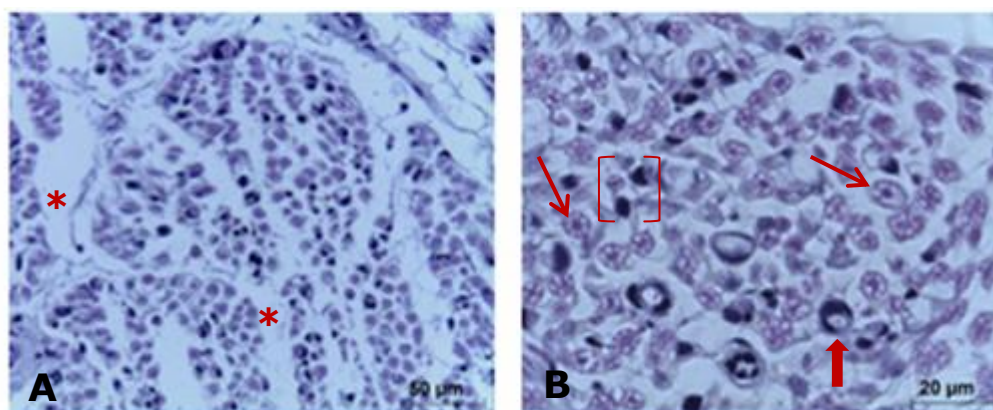
No grupo de animais neuropáticos tratados com a solução salina, percebem-se grandes espaçamento no endoneuro; estruturas circulares que são indicativos de células inflamatórias e presença de células de Schwann, além de axônios com bainha de mielina ausentes (Figura 2). A presença de células inflamatórias e células de Schwann em processo de divisão celular são características de estruturas nervosas em processo de regeneração resultantes de neuropatias. É importante observa a maior densidade de células axonais no grupo *Sham*, quando comparado ao grupo neuropático tratado com solução salina, onde existe um evidente espaço extracelular, sendo um indicativo de líquido intersticial, o que pode sugerir a presença de edema. Comparando os animais do grupo *Sham* e os tratados com solução salina, é possível determinar que houve de fato a indução de CCNC.

Figura 2 Corte transversal de nervo ciático de ratos do grupo tratado com solução salina. Em A, tem-se uma visão panorâmica de corte histológico do nervo ciático. Observar o espaço intersticial representado pelo asterisco. Verificar ainda, a menor organização celular em relação ao grupo Sham. Em B, percebe-se a presença de células de Schwann (setas) e de células inflamatórias entre colchetes Paraplast, 5µm, H-E.



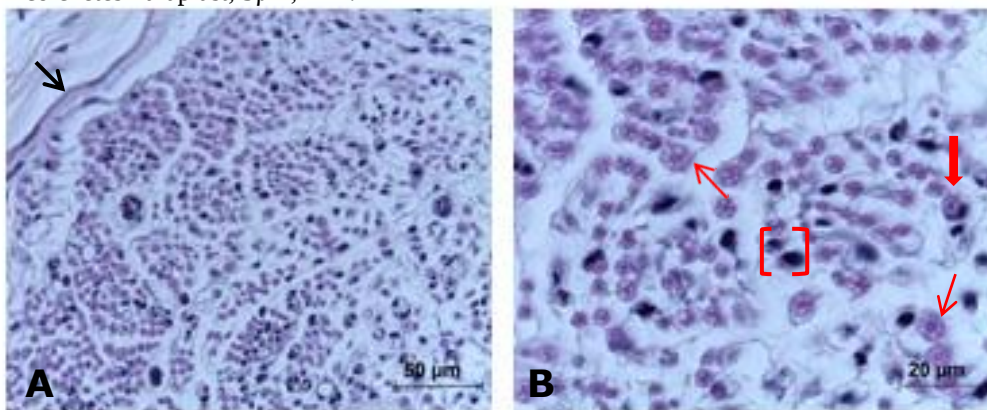
No grupo neuropático tratado com EACF, observa-se a presença de axônios mielinizados e preservados, entretanto é possível observar algumas estruturas de coloração roxa, em formato de meia-lua, contornando alguns axônios, o que sugere a presença núcleos de células de Schwann. Comparando com o grupo neuropático salino demonstrado na Figura 2 é possível observar que o grupo neuropático tratado com EACF manteve um considerável número de axônios após a indução da CCNC, entretanto percebem-se grandes espaços no endoneuro, similar ao grupo tratado com solução salina.

Figura 3 Corte transversal de nervo ciático de ratos do grupo tratado com EACF. Em A, tem-se uma visão panorâmica de corte histológico do nervo ciático. Observar o espaço intersticial representado pelo asterisco. Verificar ainda, a menor organização celular em relação ao grupo Sham. Em B, percebe-se a presença de células de Schwann (setas largas), axônios íntegros (seta fina) e de células inflamatórias entre colchetes Paraplast, 5µm, H-E.



O grupo neuropático tratado com EHCF está representado na Figura 4 onde é possível observar uma grande densidade de axônios melhor arranjados (Figura 3/A), mielinizados e preservados (Figura 3/A), comparando com o grupo tratado com solução salina (Figura 2) e o grupo neuropático tratado com EACF (Figura 3), parecendo estar com o arranjo axonal mais semelhantes morfológicamente com o grupo e *sham*.

Figura 4 Corte transversal de nervo ciático de ratos do grupo tratado com EHCF. Em A, tem-se uma visão panorâmica de corte histológico do nervo ciático. Verificar a menor organização celular em relação ao grupo Sham. Em B, percebe-se a presença de células de Schwann (setas largas), axônios íntegros (seta fina) e de células inflamatórias entre colchetes Paraplast, 5 μ m, H-E.



6. Discussão

6.1 COMPORTAMENTOS ESPONTÂNEOS

6.1.1 Expressão de motricidade (andar e empinar)

As lesões traumáticas experimentais do nervo ciático de ratos causam severas deficiências na função motora do membro posterior ipsilateral à lesão nervosa, além de uma sobrecarga funcional do membro contralateral, determinando um padrão de locomoção alterado, o que impede a correta execução da locomoção (DE MEDINACELLI et al., 1995; ILHA et al., 2006).

O fato de não observar-se diferença estatística entre os grupos tratados com EACF e EHCF em relação ao grupo tratado com solução salina, nos resultados obtidos neste estudo, estariam indicando que os extratos não exerceram efeito analgésico nos animais neuropáticos. O comportamento espontâneo de caminhar e empinar são comportamentos referentes à exploração e motricidade de acordo com Câmara (2009) em estudos com ratos. Estes comportamentos são alterados quando provocada neuropatia do nervo ciático, já que este representa a principal contribuição nervosa responsável por regular a atividade motora do membro pélvico. Nos animais deste estudo verificou-se a redução destes comportamentos, embora não tenha sido de forma significativa. No trabalho desenvolvido por Santos et al (1999) foi testado o efeito analgésico do baclofeno na neuropatia ciática experimental em ratos, tendo sido demonstrando que este fármaco não possui ação de relaxante muscular na dose de 4mg/kg, quando observados os comportamentos coçar e empinar, diferentemente do observado para doses de 8mg/kg e constatou ainda que o comportamento de empinar foi reduzido nos animais, mas não referencia ao comportamento de andar.

6.1.2 Expressão dor (coçar)

Para tentar compreender os mecanismos relacionados à dor neuropática, o modelo de registro de comportamentos espontâneos, mais especificamente, o comportamento de coçar-se relatado como um comportamento associado a dor crônica, tem sido utilizado segundo Alves et al (2010) como um modelo para avaliar a existência de dor neuropática, especialmente em estudos com ratos.

De Castro-Costa et al (1981) observaram em ratos artríticos um significativo aumento no comportamento de coçar, que era inibido utilizando-se morfina, acetilsalicilato. Kupers et al (1992) fizeram uma análise sobre os comportamentos espontâneos no modelo de dor neuropática, onde verificaram que o comportamento de coçar esteve aumentado. Nos ratos utilizados no experimento, a exemplo do observado por estes autores, registrou-se um aumento do comportamento de coçar, entre as semanas 1 a 3, como consequência da neuropatia. Esperava-se, para este comportamento uma redução no tempo de execução, especialmente nos animais tratados com os extratos. O fato do mesmo não ter diminuído impede afirmar, na dose administrada, que os extratos tenham efeito analgésico.

6.2 COMPORTAMENTOS INDUZIDOS

6.2.1 Hiperalgisia térmica ao frio e ao calor

Hiperalgisia é um termo psicofísico que atualmente é proposto para designar todas as condições de sensibilidade dolorosa aumentada. A hiperalgisia geralmente ocorre em processos inflamatórios agudos ou crônicos passando a ser um dos sintomas em processos dolorosos como a dor neuropática (IRWIN, 2011).

O modelo de teste de alodinia preconiza que seja pulverizado 0,1ml de acetona na superfície plantar do membro pélvico neuropático do animal, quando se quer avaliar sua reação ao frio, conforme descrito por Choi et al (1994). Para confirmar se a reatividade dos

axônios a estímulos químicos de frio são registradas reações relativas a comportamentos de retirada e lambadura do membro.

Nesta linha de pesquisa Thiagarajan et al (2012) utilizaram o extrato etanólico da folha da *Butea monosperma* nas doses de 200, 300 e 400 mg/Kg em ratos após a CCNC, mostrando que houve diferença estatisticamente significativa do reflexo de alodinia ao frio na dose mais alta do extrato etanólico das folhas deste vegetal. No experimento objeto deste estudo os testes de alodinia realizados não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os grupos Sham e EHCF, sugerindo a ausência de feitos analgésicos.

Muthuraman et al (2011) testaram o extrato etanólico da casca da *Acorus calamus* após a CCNC, em ratos nas doses de 100 e 200 mg/Kg e verificaram o aumento do limiar de dor, quando comparado com o grupo controle positivo, diferentemente dos resultados obtidos para os extratos de Jucá na dose utilizada.

O modelo que avalia o comportamento de hiperalgesia térmica ao calor descrito por Attal (1990) foi testado por Santos (1999) para avaliar o efeito do baclofeno na expressão comportamentos espontâneos na dor neuropática crônica. Nos testes térmicos, o baclofeno, em doses diferentes (1, 2 e 4 mg / kg), aumento significativo ($p < 0,01$), o limiar de a retirada do membro posterior, o que representa que os animais passaram a tolerar por mais tempo a presença do estímulo. Experimento na mesma linha de pesquisa foi realizado por Muthuramane Singh (2011) que estudaram a hiperalgesia térmica em ratos neuropáticos tratados com extrato hidroalcoólico da *Acorus calamus*, através do teste de placa quente. Estes observaram uma diminuição do limiar de retirada do membro pélvico esquerdo nos grupos tratados com o extrato hidroalcoólico de *Acorus calamus* nas doses de 100 e 200 mg/kg, em relação aos grupos sham. Estes resultados diferem dos obtidos por Muthuramane Singh (2011) já que estes últimos observaram um aumento do limiar nos ratos neuropáticos tratados com extrato hidroalcoólico da *Acorus calamus*. O fato dos animais terem apresentado menor limiar a dor provocada pelo calor é sugestivo de recuperação da neuropatia.

6.2.2 Reflexo extensor e flexor

Temporin et al (2009) fizeram o uso da interleucina-1 beta para avaliar a recuperação sensorial e motora, além de uma possível regeneração do nervo ciático após indução de neuropatia, através do modelo descrito por Azzouz et al (1996). Em relação a função motora, estimada pelo teste de extensão e flexão do membro pélvico, as pontuações em cada semana não apresentaram diferenças entre os grupos de animais tratados com a interleucina-1 e o grupo de animais tratados com PBS.

No nosso trabalho de neuropatia induzida por CCNC, foram realizados os modelos descritos por Azzouz et al (1996), de retirada interdigital lateral da região plantar, mostrando que os animais tratados com os EACF e EHCF emitiram reflexo no escore máximo semelhante ao observado para o grupo *Sham* na semana 3, sugerindo um efeito analgésico dos extratos da vagem da *Caesalpineia ferrea* neste modelo de comportamento.

6.2.3 Reflexo de retirada interdigital e lateral do membro

Para verificar a nocicepção do membro pélvico neuropático de ratos, é realizado testes de pinçamento baseado no modelo descrito por Kau et al (2006) que verificaram neste trabalho, a eficácia da lidocaína e bupivacaína em bloqueio do nervo ciático de ratos, através da avaliação de nocicepção por meio da retirada do membro pélvico ao pinçar uma prega de pele sobre o metatarso lateral, provocando uma dor cutânea, e também da falange distal do quinto dedo, estabelecendo uma dor profunda. A reação dos ratos para o aperto interdigital e lateral do quinto dedo do pé com uma pinça anatômica, foi classificada com base na retirada reflexo, comportamento de fuga, e vocalização, de acordo com os seguintes escores: (0) sem reflexo de retirada; (1) leve reflexo de retirada; (2) médio reflexo de retirada; (3) rápido reflexo de retirada).

No experimento realizado por Temporin et al (2008) foi utilizado o modelo acima descrito por Kau et al (2006) para verificar a recuperação sensorial do membro pélvico após

indução de neuropatia ciática. Foi constatado que no grupo de animais tratados com a interleucina-1, a pontuação do teste pinçamento do membro pélvico tende a ser melhor em cada semana, comparado com os animais do grupo controle tratados com PBS.

No nosso trabalho, foram realizados o mesmo modelo citado anteriormente de retirada interdigital lateral da região plantar, mostrando que os animais tratados com os EACF e EHCF emitiram reflexo no escore máximo semelhante ao observado para o grupo *Sham* na semana 3, sugerindo um efeito analgésico dos extratos da vagem da *Caesalpineia ferrea* neste modelo de comportamento.

6.2.4 Teste de contorção abdominal

Após injeção intraperitoneal de um agente nocivo, os ratos mostram uma resposta de constrição e alongamento longo da parede abdominal, numa sequência de torção do tronco e seguido por extensão dos membros pélvicos.

O modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético é bastante utilizado para avaliação de nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto a nível central quanto periférico (COLLIER et al., 1968).

No estudo de Carvalho e colaboradores (1996) foi utilizado o extrato aquoso da vagem da *Caesalpineia ferrea* para avaliar contorções abdominais em ratos induzidas por ácido acético, utilizando o mesmo modelo descrito por Collier (1968). Os grupos tratados previamente com 10 e 20 mg/kg de extrato aquoso da *Caesalpineia férrea* e 20 mg/Kg de indometacina exibiram uma redução significativa no número de contorções abdominais em 88%, 92% e 51%, respectivamente, sendo considerada dose-dependente. O grau de inibição das contorções induzidas pelo extrato aquoso estava estatisticamente significativa para $p < 0,05$, quando comparada com o grupo controle.

Sousa e colaboradores (2010) testaram os efeitos antinociceptivo e antiinflamatório do extrato hidroalcoólico das folhas de *Duguetia lanceolata* em modelo de contorção abdominal em ratos. O extrato etanólico reduziu, significativamente ($p < 0,05$), as contorções abdominais nas doses de 10, 50, 100 e 200 mg/Kg, quando comparado ao grupo controle salina.

Dutra e colaboradores (2006) investigaram as atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*, em camundongos através de testes de contorção abdominal induzidos ácido acético nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, mostrando uma inibição das contorções abdominais em 34,30%, 35,84% e 36,07%, respectivamente.

Cândido (2006) estudou os efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas da *Hyptis fruticosa* utilizando o mesmo modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos, nas doses de 20, 100, 500mg/Kg, havendo uma diminuição significativa no número de contorções abdominais dos grupos tratados com o extrato hidroalcoólico comparados com o grupo salina.

6.2.5 Teste de hiperalgesia térmica induzida por carragenina

A carragenina é um agente pró-inflamatório muito conhecido e utilizado em estudos envolvendo a hiperalgesia inflamatória em ratos e camundongos (MORRIS, 2003) onde há formação de edema, resultante da rápida produção de mediadores inflamatórios, sendo um modelo largamente utilizado para verificar a ação antinociceptivas de compostos analgésico e anti-inflamatórios.

Muitos modelos destinados a avaliar os efeitos antinociceptivo de substâncias com possíveis efeitos analgésicos fazem o uso de testes de hiperalgesia térmica ao calor, que vão desde modelos que utilizam placa metálica quente, exposição a um foco de luz e banho-maria, verificando a reatividade do animal frente a um estímulo nociceptivo.

Klein Junior (2011) utilizou o extrato metanólico de *Polygala cyparissias* para testar a atividade antinociceptiva em camundongos na dose de 30 mg/Kg para avaliar os efeitos anti-hipernociceptivos através do modelo de hipernocicepção induzida por carragenina. Pode-se observar que o tratamento preventivo com o extrato metanólico foi capaz de reduzir significativamente a hipernocicepção mecânica quando comparado ao grupo hipernocicepção inflamatória até às 24h após a administração do agente irritante. No mesmo trabalho outro modelo utilizado para a avaliação da atividade anti-hipernociceptiva demonstrado que o extrato metanólico de *P. cyparissias* foi capaz de reduzir o limiar de sensibilidade mecânica

dos camundongos quando comparado aos valores basais. Além disto, o tratamento preventivo reduziu significativamente a hipernocicepção mecânica quando comparado ao grupo controle.

Santos (2010) utilizou o extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpineia pyramidalis* em camundongos nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg no teste de placa quente aquecida a uma temperatura de $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para avaliar o estímulo térmico, o que aumentou o tempo de latência do membro ao estímulo térmico ($p > 0,05$).

Silva et al (2001) avaliaram o efeito analgésico do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* em camundongos nas doses de 1 e 2g/kg. O estímulo nociceptivo consistiu na exposição da cauda dos animais a um foco de luz de 70 Watts. O aumento do tempo de resposta dos animais ao calor foi dose dependente, e o tratamento com a maior dose (2g/Kg) produziu efeito similar ao controle positivo (fentanil). O aumento significativo da latência na resposta dos camundongos ao estímulo nociceptivo sugeriu a presença de compostos com atividade analgésica.

A utilização da dose de 300mg/Kg dos EACF e EHCF não tiveram um aumento significativo do período de latência do membro pélvico dos animais em banho-maria após estímulo nociceptivo da carragenina quando comparado ao grupo controle tratado com solução salina, apesar dos tempos de permanência do membro pélvico dos animais tratados com os extratos terem sido maiores.

6.2.6 MORFOLOGIA DO NERVO CIÁTICO APOS INDUÇÃO DA CCNC

Thiagarajan e colaboradores (2012) utilizaram o extrato hidroalcoólico das folhas da *Butea monosperma* na neuropatia ciática em ratos, seguindo o mesmo modelo de CCNC de Bennett e Xie(1988), modificado por Seltzer, Dubner e Shir (1990). Foi utilizado o extrato hidroalcoólico nas doses de 200, 300 e 400 mg/kg durante quatro semanas de indução neuropática por CCNC. Administração do extrato hidroalcoólico da *Butea monosperma* atenuou significativamente a CCNC induzida, mostrando em cortes transversais do nervo ciático corados com H-E, através de atenuação de edema axonal, desarranjo das fibras nervosas e expressão de células de Schwann, comparados com o grupo controle.

É possível avaliar uma diferença entre as estruturas histológicas entre os grupos tratados com o extrato da vagem da *Caesalpineia ferrea* e os grupos *Sham* e *Salino*, no que diz respeito a morfologia dos axônios.

Muthuramane Singh (2011) induziram a CCNC em ratos com mesmo modelo de Bennett e Xie(1988), modificado por Seltzer, Dubner e Shir (1990) utilizaram o extrato hidroalcoólico do caule da *Acorus calamus*, e ao longo de quatro semanas de tratamento, resultou em significativas mudanças histopatológicas. Em cortes transversais do nervo ciático corados com H-E e avaliados qualitativamente sobre microscopia de luz, foi possível verificar um edema axonal e um aumento do número de células de Schwann nos grupos controle negativo. Porém, nos grupos tratados com o extracto hidroalcoólico da *Acorus calamus* nas doses 100e 200 mg /kg, atenuou significativamente o inchaço e o desarranjo das fibras nervosas. No entanto, não foi observado nenhum efeito significativo no comportamento espontâneo de locomoção ou exploração dos animais, corroborando com o nosso experimento que utilizou uma dose similar do extrato hidroalcoólico de *Caesalpineia ferrea* para avaliar comportamentos espontâneos de ratos após indução de CCNC.

Ding, Cheng e Gu (2008) utilizaram o extrato aquoso da raiz da *Achyranthes bidentata* das doses de 10 e 20 mg/Kg para tratar durante quatro semanas, coelhos neuropáticos induzidos por esmagamento do nervo fibular através de fórceps hemostáticos. Utilizando a coloração de tricrômico, mostrou que as fibras nervosas mielinizadas foram raras e um arranjo desordenado no grupo placebo. Nos grupos tratados com o extrato aquoso da raiz da *Achyranthes bidentata* das doses de 10 e 20 mg/Kg, as fibras nervosas estavam mielinizadas, e foram regeneradas com disposição ordenada e em feixes maciços. O número de fibras nervosas regeneradas e mielinizadas no grupo salina foi significativamente menor do que em ambos os grupos tratados com o extrato aquoso do caule da *Achyranthes bidentata*.

Wannannond e colaboradores (2012) testaram o extrato hidroalcoólico das folhas da *Phyllanthus amarus* após indução neuropática do nervo ciático em camundongos, utilizando um microfórceps, nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg durante um período de quatro semanas. A avaliação histológica foi realizada através da coloração em H-E para avaliar a morfometria e a densidade dos axônios. Verificou-se que os animais que receberam o extrato da planta mostraram menos axônios degenerados e em maior densidade do que os grupos tratados com o veículo.

Um dos objetivos do presente estudo foi reproduzir o modelo de CCNC de Bennett e Xie (1988) através da avaliação de comportamentos de dor espontânea como o andar e coçar, considerados como comportamentos indicativos de dor crônica.

Após três semanas de tratamento (12/12 h) com o veículo salina nos grupos Salina e Sham, e com os grupos tratados com EACF e EHCF, não houve diferença significativa entre os grupos no que diz respeito aos comportamentos espontâneos citados anteriormente.

Os resultados dos estudos analgésicos e regenerativos dos EACF e EHCF demonstram um potencial analgésico na dor neuropática periférica, demonstrados nos teste de dor induzida representados pelo modelos de reflexos e de contorção abdominal. Também nos resultados histológicos, é possível observar um maior número de axônios preservados nos grupos de animais tratados com o EACF e EHCF, comparados com o grupo neuropático tratado com solução salina, o que podemos sugerir um efeito neuroprotetor na neuropatia periférica.

7 CONCLUSÕES

- a) A dose de 300mg/kg de extratos aquoso (EACF) e hidroalcoólico (EHCF) da vargem da *Caesalpineia ferrea* na neuropatia traumática experimental induzida pelo esmagamento do nervo ciático não pode ser utilizada como analgésico, com base nos resultados obtidos.
- b) O uso dos extratos aquoso (EACF) e hidroalcoólico (EHCF) da vargem da *Caesalpineia ferrea* na avaliação dos comportamentos relativos à motricidade no tratamento da neuropatia crônica não alterou a execução destes comportamentos;
- c) Os achados histológicos objeto da análise dos nervos ciáticos neuropáticos indicam que há evidências quanto à capacidade de regeneração dos axônios, em animais tratados com os extratos vegetais.
- d) Os resultados obtidos para avaliar analgesia em dor periférica, modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético e hiperalgesia térmica induzida por carragenina, também são indicativos da ausência de efeito analgésico dos extratos da vargem da *Caesalpineia ferrea*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cellular and molecular immunology. 5a ed. São Paulo: Elsevier, 2005, 562 p.
- ALVES, N.D.; SANTOS, T.J.T.; COSTA, S.B.C.; COSTA A.M.B.; FEIJÓ, F.M.C.; DE CASTRO COSTA, C.M. Comportamentos espontâneos e induzidos em ratos com dor neuropática por constrição crônica do nervo ciático. **Revista Dor**, 2010;11(1):55-62.
- AMOROZO, M. C. M.; GELY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas, Barcarena, PA, Brasil. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Série Botânica, Belem, v. 4, n. 1, p. 47-131, 1988.
- ANDRAUS, R.A.C. Os efeitos da radiação de baixa potência na regeneração do nervo fibular comum do rato submetido à lesão por esmagamento. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- ATTAL N, JAZAT F, KAYSER V ET AL. Further evidences for pain-related behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. **Pain** 1990;41:235-251.
- AZZOUZ, M.; KENEL, P.F.; WARTER, J.M.; POINDRON, P.; BORG, J. Enhancement of mouse sciatic nerve regeneration by the long chain fatty alcohol, N-hexacosanol, **Exp. Neurol.** 138 (1996) 189–197.
- BELCHIOR, A.C.G.; REIS, F.A.; NICOLAU, R.A.; SILVA, I.S.; PEREIRA, D.M.; CARVALHO, P.T.C. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers Medicine Science** (2009) 24:893–899 DOI 10.1007/s10103-008-0642-3.
- BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.
- BRAGANÇA, L.A.R et al. **Plantas Medicinais Antidiabéticas**, Niterói : EDUFF, 1996.p. 172.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapies). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CÂMARA, C.C. Estudo dos efeitos antinociceptivos, comportamentais e regenerativos do tratamento com gabapentina em modelo experimental de dor neuropática. (Tese) (Doutorado em farmacologia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.
- CÂNDIDO, E.A.F. Caracterização parcial dos efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas da *hyptis fruticosa* salzm. (ex) benth. no sistema nervoso central de camundongos. Dissertação

(mestrado em ciências da saúde) Universidade Federal de Sergipe, pró-reitoria de pós graduação e pesquisa, núcleo de pós graduação em Medicina.2006.

CAVALHEIRO, M.G.; FARIAS, D.F.; FERNANDES, G.F.; NUNES, E.P.; CAVALCANTI, F.S.; VASCONCELOS, I.M.; MELO, V.M.M.; CARVALHO, A.F.U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso da *Caesalpiniaferrea* Mart.,Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.2B, p.586-591, 2009.

CARVALHO,A.C.B.; BALBINO,E.E.; MACIEL,A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(2): 314-319, Abr./Jun. 2008.

CARVALHO, J.C.T., TEIXEIRA, J.R.M., SOUZA, P.J.C. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpiniaferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 53, p. 175-178, 1996.

CHOI Y.; YOON, Y.W.; NA H.S.; KIM, S.H.; CHUNG, J.M.: Behavioural signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 1994, 59:369-376.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHSON, C.A.; SCHNEIDER, C. the abdominal constriction response and its suppression analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32. 295-310, 1968.

COSTA, H.J.Z.R.; SILVA, C.F.; KORN, G.P.; LAZARINI, P.R. Regeneração pós-traumática do nervo facial em coelhos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, 2006;72(6):786-93.

DE CASTRO-COSTA, M.; De SUTTER, P.; GYBELS, J.; VAN HEES, J. Adjuvant induced arthritis in rats: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, v. 13, n. 2, p. 205-206, June 1981.

DE MEDINACELI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. An index of the functional conduction of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp Neurol**. 1982; 77:634-43.

DING, F.; CHENG,Q; GU, X. The repair effects of *Achyranthes bidentata* extract on the crushed common peroneal nerve of rabbits. F. Ding et al. / **Fitoterapia** 79 (2008) 161–167.

DI STASI, L.C., LIMA, C.A.H. Plantas medicinais da Amazônia e da mata atlântica. 2ª Edição. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DUTRA, R.C.; TAVARES, C.Z.; FERRAZ, S.O.; SOUZA, O.V.; PIMENTA, D.S. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16(4): 469-474, Out./Dez. 2006

ENDO, C. Estudo dos efeitos do tratamento com laser num modelo experimental de lesão por esmagamento de nervo ciático de ratos. 2002. 70 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

FAWCETT, J. W.; KEYNES R. J. Peripheral Nerve Regeneration. **Annu. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, v.13, p.43-60, 1990.

FLETCHER, T.F. Nervous tissue. In: Dellman, H.D., Eurell, J.A. (eds) Textbook of veterinary histology. Willians and Wilkins, Baltimore, pp 91-113, 1998.

FRANDSON, R.D.; WILKE, W.L.; FAILS, A.D. Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda. Sexta Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., 2005.

FREDERICKS, C.M.; SALADIN, L.K. Pathology of the motor systems : principles and clinical presentations. Philadelphia: F.A. Davis Company, 346-372, 1996.

GIULIETTI, ANA MARIA; HARLEY, RAYMOND M.; QUEIROZ, LUCIANO P. DE; WANDERLEY, MARIA DAS GRAÇAS L.; BERG, CASSIO VAN DEN. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. MEGADIVERSIDADE | Volume 1 | Nº 1 | Julho 2005

GORDON. T.; SULAIMAN, O.; BOYD, J.G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. **J.Peripher.Nerv.Syst.**, 8: 236-250, 2003.

GRANT, G.A.; GOODKIN, R.; KLIOT, M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. **Neurosurgery** 1999;44(4):825-39

IASP Committee for Research and Ethical Issues. Ethical standards for Investigation of Experimental Pain in Animals. **Pain**. v. 16, p. 109-110, 1983.

IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neurosci. Res.**, Limerick, v.25, p.101-121, 1996.

ILHA, J. Efeitos do exercício físico específico na recuperação funcional da locomoção e regeneração nervosa periférica após lesão traumática experimental do nervo ciático em ratos adultos. 2007. 60 p. (Dissertação) (Mestrado em neurociências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

IRWIN, M.R. Inflammation at the intersection of behavior and somatic symptoms. **Psychiatric Clinics of North America**, v.34, n.3, p.605-620, 2011.

JANG, C.H.; CHO, Y.B.; CHOI, C.H. Effect of ginkgo biloba extract on recovery after facial nerve crush injury in the rat, **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.** (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2012.09.009>.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

KARTJE, G.L.; SCHWAB, M.E. Axonal growth in the adult mammalian nervous system: regeneration and compensatory plastic. **Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects**. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 517-527.

KIERSZENBAUM, A.L. Histologia e biologia celular: uma introdução á patologia. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KAU, Y.C.; HUNG, Y.C.; ZIZZA, A.M.; ZURAKOWSKI, D. ; GRECO, W.R.; WANG, G.K.; GERNER, P. Efficacy of lidocaine or bupivacaine combined with ephedrine in rat sciatic nerve block, Reg. Anesth. **Pain Med.** 31 (2006) 14–18.

KLEIR JUNIOR, L.C. Contribuição ao estudo farmacognóstico de Polygala cyparissias Saint-Hilaire & Moquin (Polygalaceae): Aspectos químicos e avaliação do seu potencial gastroprotetor e anti-hipernociceptivo. (Dissertação)(Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade do vale do Vale do Itajaí. Itajaí, 2011.

KUPERS, R. C.; NUYTTEN, D.; DE CASTRO-COSTA, M.; GYBELS, J. M.A time course análisis of the changes in spontaneous and evoked behaviour in a rat model of neuropathic pain.**Pain**, v. 50, p. 101-111, 1992.

LANDON, D.N.; HALL, S. The myelinated nerve fiber. In: LANDON, D.N. (Ed.) **The peripheral nerve**. London: Chapman and Hall, 1976. 105p.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1987. 369p.

LIMA, S.M.; ARAÚJO,L.C.; SITÔNIO,M.M.; FREITAS,A.C.C.; MOURA,S.L.; CORREIA,M.T.S.; MALTA,D.J.N.; GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and analgesic potential of. Brazilian Journal of Pharmacognosy 22(1): 169-175, Jan./Feb. 2012.

LOESER, J.D. and MELZACK, R. Pain: na overview. **The lancet.**, 353: 1607-1609, 1999.

MACHADO, A. B. M. Neuroanatomia Funcional, São Paulo - Rio de Janeiro: Atheneu, 1991.

MACKINNON SE, HUDSON AR, HUNTER DA.Histologic assessment of nerve regeneration in the rat.**PlastReconstr Surg.** 1985 Mar;75(3):384-8.

MEDONÇA AC, BARBIERI CH, MAZZER N. (2003) Directly applied low intensity direct electric currents enhances peripheral nerve regeneration in rats.**JNeurosciMeth** 129: 183-190.

MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Avaliação dos Efeitos Antitussígenos e Expectorantes de Duas Formulações Fitoterápicas Existentes no Mercado Brasileiro. **Acta farmacéutica bonaerense**- vol. 25 nº 1 - 2006.

MENEZES,I.A.C.; MOREIRA,I.J.A.; CARVALHO, A.A.C.; ANTONIOLLI,A.R.; SANTOS, M.R.V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from Caesalpiniaferrea: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology** 47 (2007) 41–47

MONTE-RASO VV, BARBIERI CH, MAZZER N, FAZAN VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. **Revista brasileira de fisioterapia.** 2006; 10(1): 113-119.

MONTE-RASO VV, BARBIERI CH, MAZZER N, FAZAN VPS. Can therapeutic ultrassound influence the regeneration of peripheral nerve? **Journal of Neuroscience Methods**, 142: 185-192, 2005.

MORANI,A.S.; BODHANKAR,S.L.; MOHAN,V.; THAKURDESAI, P.A. Ameliorative effects of standardized extract from *Trigonellafoenumgraecum*L.seeds on painful peripheral neuropathy in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** (2012)385-390

MUTHURAMAN, M.; SINGH, N. Attenuating effect of *Acoruscalamus* extract in chronic constriction injury induced neuropathic pain in rats: an evidence of anti-oxidative,anti-inflammatory, neuroprotective and calcium inhibitory effects. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2011, 11:24

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE JUNIOR, F.Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpiniaferrea*and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, p. 119-124, 2002.

NOZAKI, H., HAYASHI, K., KIDO, M., KAKUMOTO, K., IKEDA, S., MATSUURA, N., TANI, H., TAKAOKA, D., IINUMAE, M., AKAO, Y., 2007. Pauferro A, a novel chalconetrimerwith a cyclobutane ring from *Caesalpiniaferrea* Mart exhibiting DNA topoisomeraseII inhibition and apoptosis-inducing activity.**TetrahedronLetters** 48, 8290–8292.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpiniaferrea*Mart. exTul. var.*ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos.**Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.3, p.302-310, 2010.

OLIVEIRA, E. F.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; SELLI, M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. **Journal of ReconstructiveMicrosurgery**, New York, v. 17, n. 1, p. 69-75, 2001.

O’SULLIVAN, S.B.; SCHMITZ, T.J. **Fisioterapia, avaliação e tratamento**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1993. 775p.

PEREIRA, L.P. Atividade anti-inflamatória de polissacarídeos isolados das plantas *Caesalpineia ferrea* e *Azadirachta indica*. (Dissertação) (Mestrado em ciências fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2011.

PETERS, V.M.; SOUZA, S.O.; CARVALHO, J.C.T.; BORGES, L.V.; GUERRA, M.O. Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpineiaferrea* Mart. In rats.**Bol.Latino American Caribe Plant. Med. Aromaticas**. v.7, n.5, p.268-272, 2008.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 α , 6 α , 16 α -trihydroxy-20(29)-ene obtained from flowers of *Combretum leprosum* in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.83, ed. 1, pp. 90-99, 2006.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, V.39, P. 603-13, 2001.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: _____ DEY, P. M.;

REIS, F.A.; BELCHIOR, A. C. G.; CARVALHO, P. T. C.; SILVA, B. A. P.; PEREIRA, D. M.; SILVA, I. S.; NICOLAU, R.A. Effect of laser therapy (660nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurectomy followed by epineural anastomosis. **Lasers in Medical Science**. London, v. 24, p. 741-747, 2009.

RIBEIRO, A. Q et al. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n 1, p. 65-70, 2005.

ROCHKING, S.; TREJO, L. L.; NISSAN, M.; SHAMIR, M. H.; KHARENKO, O.; ALON, M. Efficacy of 780nm laser phototherapy on peripheral procedure regeneration after neurotubule reconstruction procedure. **Photomedicine and Laser Surgery**. New Rochelle, v. 25, n. 3, p. 137-143, 2007.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. Histologia: texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

RYDEVIK, B; LUNDBORG, G. ; BAGGE, U. Effects of graded compression on intraneural blood flow. **The journal of hand surgery**. American Society for Surgery of the Hand. (1981).

SAKAKIMA, H., et al. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 14, p. 186-192, 2004.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology** 124 (2009) 289–294

SANTOS, C.A. Estudo farmacológico do extrato etanólico da casca da *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Dissertação (Mestrado em ciências da saúde). Universidade Federal de Sergipe. Aracaju, 2010.

SANTOS, T.J.T.; DE CASTRO-COSTA, C.M.; GIFFONI, S.D.A.; SANTOS, F.J.C.; RAMOS, R.N.S.; GIFFONI, M.A.C. the effect of baclofen on spontaneous and evoked behavioural expression of experimental neuropathic chronic pain. **Arq Neuropsiquiatr** 1999;57(3-B): 753-760.

SEDDON, H. J. Surgical Disorders of the Peripheral Nerves. Edinburgh, London e New York: Churchill Livingstone, p.58, 194, 200, 1975.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, p. 205-218, 1990.

SILVA, B.T.F.; NUNES, S.F.L.C.; FREIRE, S.M.F. Efeito antiinflamatório, analgésico e antipirético do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* varo flavicarpa (maracujá-amarelo). **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 12, n. 112, p. 28-37, jan.rdez. 2001.

SHORES, A. Traumatic and neoplastic diseases of the brachial plexus. In: BOJRAB, M.J. **Diseases mechanism in small animals**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. i 175-1182.

SOBRAL LL, OLIVEIRA LS, TAKEDA SYM, SOMAZZ MC, MONTEBELO MIL, TEODORI RM. Exercício imediato versus tardio na regeneração do nervo isquiático de ratos após axoniotmese: análise morfométrica e funcional. **Rev. Bras. Fisiot.** 2008; 12(4): 311-6.

SON, Y.; THOMPSON, W. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. **Neuron**, Cambridge, v.14, p.125-132, 1995.

SOUSA, G.D.V.V.; AMARAL, M.P.H.; YAMAMOTO, C.H.; ALVES, M.S. Efeitos Antinociceptivo e Antiinflamatório do Extrato Etanólico das Folhas de *Duguetia lanceolata*. **Lat. Am. J. Pharm.** 27 (3): 398-402 (2008).

SOUZA, V.H.; BARBOSA, A.P.O.; CARDOSO, G.C.; MARRETO, R.N.; BARRETO-FILHO, J.A.S. ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS M.R.V. Avaliação do Potencial Antidiabético de Cinco Plantas Medicinais em Ratos. **Latin American Journal of Pharmacy**. 28(4): 609-12 (2009).

TEMPORIN, K.; TANAKA, H.; KURODA, Y.; OKADA, K.; YACHI, K.; MORITOMO, H.; MURASE, T.; YOSHIKAWA, H. Interleukin-1 beta promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury. **Neuroscience Letters** 440 (2008) 130–133.

THIAGARAJAN, V.R.K.; SHANMUGAM, P.; KRISHNAN, U.M.; MUTHURAMAN, M.; SINGH, N. Ameliorative potential of *Butea monosperma* on chronic constriction injury of sciatic nerve induced neuropathic pain in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (2012) 84(4): 1091-1104.

TOMAZ, K.L.R. Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da *Caesalpinia ferrea* Martius frente a bactérias causadoras de mastite bovina. (Dissertação) (Mestrado em ciência animal). Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 2010.

TONGE, D.A.; GOLDING, J.P. Regeneration and repair of the peripheral nervous system. **Seminars in the neuroscience** 8, Vol 5, 1993 : pp 385-390.

VEAS, J.A.R. Utilização do teste de análise da marcha como método de avaliação funcional após lesões segmentares em nervo ciático de ratos. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

UDINA, E.; CEBALLOS, D.; GOLD, B.G.; NAVARRO, X. FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers. **Experimental Neurology** 183 (2003) 220–231.

WANNANNOND, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S.; THIPKAEW, C.; THUKHUMMEE, W.; LEELAYUWAT, N; SRIPANIDKULCHAI, B. *Phyllanthus amarus* Facilitates the Recovery of Peripheral Nerve after Injury. **American Journal of Applied Sciences** 9 (7): 1000-1007, 2012.

WEINSTEIN, S. M.; HERRING, S. A. Nerve problems and compartment syndromes in the hand, wrist and forearm. **Clin.Sport.Med.**, New York, v.11, n.1., p.161-188, 1992.