



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
CURSO DE ODONTOLOGIA**

**LUIZA CLERTIANI VIEIRA ALVES**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICAS E CENTRAIS EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE NEURALGIA TRIGEMINAL**

**FORTALEZA**

**2017**

LUIZA CLERTIANI VIEIRA ALVES

ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICAS E CENTRAIS EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE NEURALGIA TRIGEMINAL

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado à Coordenação do curso de  
Odontologia da Universidade Federal do Ceará  
como requisito parcial para obtenção de título  
de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Delane Viana Gondim.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A1a ALVES, LUIZA CLERTIANI VIEIRA.  
ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICAS E CENTRAIS EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE NEURALGIA TRIGEMINAL / LUIZA CLERTIANI VIEIRA ALVES. – 2017.  
43 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,  
Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Delane Viana Gondim.

1. Neuralgia trigeminal. 2. Dor. 3. Nervo infraorbital. I. Título.

CDD 617.6

---

LUIZA CLERTIANI VIEIRA ALVES

ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICAS E CENTRAIS EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE NEURALGIA TRIGEMINAL

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado à Coordenação do curso de  
Odontologia da Universidade Federal do Ceará  
como requisito parcial para obtenção de título  
de Bacharel em Odontologia.

Aprovada em: 19/12/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Delane Viana Gondim (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Ms. Helson Freitas da Silveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico a Deus.

A minha mãe Lourdes, meu pai Clerton e meu  
irmão Clerton.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças para chegar até o presente momento, por não permitir que me abatesse mesmo diante a tantas dificuldades. Posso dizer que os problemas enfrentados serviram de alicerce para formação pessoal que tenho hoje.

Agradeço a minha família pelo incondicional apoio a todas as minhas decisões, mesmo diante de todas as situações que passamos. Família é o meu maior tesouro, é o meu "por quê", o meu "para quê", e com eles pude alcançar esse sonho. Obrigada Pai (Clerton), Mãe (Lourdes) e irmão (Clerton) por me ajudarem nessa caminhada tão árdua, porém repleta de amor e superação. Sou grata a Deus e a vocês por ter me tornado o que sou hoje. Felicidade para mim é poder dividir mais essa conquista com as pessoas que mais amo na vida, minha família.

Agradeço a minha "família científica", sendo a figura materna a Professora Delane. Acredito que Deus atua através das pessoas, dessa forma podemos ser anjos nas vidas das pessoas, e a Professora Delane é um desses na minha vida. Muito obrigada, Professora, por todo apoio e ajuda sempre que precisei, obrigada por conseguir enxergar sempre além (não precisava eu falar que algo não ia bem, a Sra sempre com o instinto materno conseguia detectar), obrigada por acreditar em mim e me permitir conquistas que eu jurava ser apenas sonhos, obrigada por todo aprendizado, conhecimento, oportunidades, conselhos, carinho e amizade. Deus continue a lhe abençoar com todo esse ânimo característico seu para realizar com sucesso tudo que se propõe a fazer. Obrigada por ajudar a permitir que esse momento se realize.

Na minha "família científica" tenho irmãos e primos os quais foram fundamentais na minha formação. Helson, muito obrigada pela amizade e apoio quando precisei, pelos conselhos e aprendizado, sabemos o quanto foi árduo a realização da pesquisa, mas o quão gratificante é colher os frutos, obrigada pela paciência e por me ensinar a realizar e analisar um trabalho de forma correta. Obrigada Luane por todas as conversas e conselhos, com toda certeza, foram muito importantes. Obrigada Howard e Robertinho por sempre se preocuparem comigo e por distribuir e arrancar sorrisos. Agradeço a Prof<sup>ª</sup> Mariana e ao LAFICA (laboratório o qual tenho enorme carinho e respeito) pela oportunidade de desenvolver as pesquisas. Mario Lisboa, muito obrigada por ter me iniciado nesse universo científico, por ter feito, junto com a Prof<sup>ª</sup> Delane, eu me apaixonar pelos laboratórios, obrigada pela amizade, aprendizado e boas risadas, mesmo aos finais de semana em laboratório ou em apagões. Anamaria, obrigada pelas boas conversas e por sempre me socorrer quando eu mais precisava

de qualquer coisa no laboratório. Bruno e Diego, vocês são os melhores companheiros IC's, obrigada por dividimos muitos aperreios, experimentos e risadas. Joana, Amanda e Kalina obrigada por também me socorrerem nos experimentos e por sempre distribuírem um bom abraço.

Sou grata a todos os professores que tive por transmitirem seu conhecimento e conseguirem extrair de nós nosso potencial. Agradeço ao Professor Mario Mota, ótimo exemplo de compromisso com a docência, por todo aprendizado e pelo aceite de compor minha banca de TCC.

Agradeço aos meus colegas de turma por dividir comigo todos esses anos e todas as experiências vividas nas disciplinas e clínicas, sabemos o quanto precisamos nos ajudar (nos desesperos de vésperas de provas, empréstimo de materiais e instrumentais, EPI's). Obrigada por proporcionarem algumas das melhores lembranças que terei na graduação.

Agradeço em especial a minha dupla, Nayara Oliveira, por toda amizade e companheirismo, com você pude dividir as tristezas e multiplicar as alegrias. Agradeço a Deus por ter me dado uma amizade tão pura, sincera e tão fraterna. É incrível como temos tanto em comum e o quanto uma entende a outra. Obrigada por tudo, amiga. Não consigo imaginar como teria sido essa graduação sem você. Dupla Chris&Greg, a dupla "desesperada" que chega a ser cômica. Claro que não poderia esquecer de agradecer as "n" caronas nesses 5 anos, muitíssimo obrigada.

Obrigada, Juliana Mara, pela amizade que aflorou nesse final de curso e que foi fundamental para as escolhas que vim a tomar para escolha profissional. Você é, para mim, um exemplo de generosidade, determinação e companheirismo. Obrigada por viver esse mundo a cirurgia comigo (plantões e monitoria) e por acreditar em mim. Com a benção de Deus iremos dividir o sonho de viver essa especialidade tão linda e que nos aproximou.

Obrigada, Lucas Moreira, por sempre estar disponível para tirar minhas dúvidas nas épocas de provas, foi sem dúvidas essencial. Obrigada Nayhara e Lucivânia pelo companheirismo e boas conversas. Obrigada Isadora e Karol por dividirem a ótima experiência proporcionada pelo CRUTAC, foi incrível poder conhecer melhor vocês e o quanto nos divertimos.

Agradeço aos projetos de extensão (NUPEC, GEPIS, Liga do Trauma Bucomaxilofacial) que tive o privilégio de ser integrante por me proporcionarem vivências únicas e que me fizeram crescer profissionalmente e como ser humano.

Agradeço ao Professor Renato Maia pela rica oportunidade e aprendizado na monitoria e na Liga do Trauma Bucomaxiofacial. Agradeço a toda equipe de pós-graduação

da cirurgia pelo aprendizado e experiências na especialidade. Obrigada, Saulo, pela amizade e preocupação em poder ampliar nosso conhecimento na monitoria.

Aos meus companheiros de Liga, obrigada pela amizade e por dividirem os plantões tão repletos de aprendizado. Sou grata ao IJF que me proporcionou experiências únicas que foram fundamentais na decisão da minha escolha pela especialidade em CTBMF. Agradeço aos meus colegas residentes por todo apoio e aos Staffs da BMF pelas orientações, profissionais os quais tenho profunda admiração.

Agradeço a FUNCAP pelo financiamento da bolsa (PIBIC) e apoio a pesquisa desenvolvida nesses 4 anos de graduação.

## **APRESENTAÇÃO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) encontra-se sob o formato de artigo científico, seguindo as normas da revista “European Journal of Pain” (anexo C), porém a conversão em língua inglesa se dará no momento da publicação. As normas da revista constam nos anexos deste trabalho. Trata-se de uma pesquisa experimental em ratos com o intuito de mostrar as alterações morfológicas ocorridas na via trigeminal na presença de neuropatia do nervo infraorbital.

## SUMÁRIO

	Resumo .....	10
1	Introdução .....	12
2	Métodos .....	14
2.1	Animais .....	14
2.2	Neuralgia trigeminal induzida por ligadura do NIO .....	14
2.3	Teste nociceptivo – Hiperalgisia e alodínia mecânica.....	14
2.4	Imunofluorescência .....	15
2.5	Análise dos dados .....	16
3	Resultados .....	18
4	Discussão .....	19
	Contribuição dos Autores .....	22
	Legendas .....	23
	Referências .....	25
	Figuras .....	28
	Anexo A .....	35
	Anexo B .....	36
	Anexo C .....	37

## **ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICAS E CENTRAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEURALGIA TRIGEMINAL**

### **RESUMO:**

**Introdução:** A neuralgia trigeminal (NT) é uma doença crônica debilitante, caracterizada por uma dor lancinante, limitada a um ou mais ramos do nervo trigêmeo. O modelo de ligadura parcial demonstrou efetivamente simular muitas das características de síndromes de dor neuropática humana.

**Objetivos:** Avaliar as alterações morfológicas na via trigeminal na neuropatia induzida por ligadura do nervo infraorbital (NIO) em ratos.

**Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar com 6 animais por grupo, sendo: C, NT e NT-Sham. A NT foi induzida através de constrição do NIO. A mensuração do limiar nociceptivo foi feita através do uso de analgesímetro em região da pele das vibrissas. Os animais foram eutanasiados e coletados pele, NIO, gânglio trigeminal (GT) e trato espinhal do trigêmeo (TE - região Sp5c) no 21º dia após procedimento cirúrgico. Foi realizado imunofluorescência com os anticorpos DAPI, anti-PGP 9.5, anti-NeuN, anti-ATF-3, anti-c-Fos, anti-PBM.

**Resultados:** Na avaliação da nocicepção mecânica ocorreu redução do limiar nociceptivo no grupo neuropático. Na imunofluorescência, foi observado aumento significativo de expressão de c-Fos no grupo neuropático em GT e TE, já a marcação de ATF-3 houve aumento expressivo somente em GT. Houve aumento significativo de expressão de PBM no NIO e de PGP 9.5 na pele das vibrissas somente no grupo neuropático.

**Conclusão:** Foram observadas alterações morfológicas ao longo da via nociceptiva, sugerindo que as mesmas podem ser causadoras e perpetuadoras do quadro neuropático no modelo de ligadura do NIO em ratos.

**Significância:** O reconhecimento das alterações na via nociceptiva trigeminal são úteis para a compreensão do surgimento e dos fatores mantenedores da dor trigeminal, servindo de embasamento para adoção de terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas.

## **MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF PERIPHERAL AND CENTRAL CHANGES IN EXPERIMENTAL MODEL OF TRIGEMINAL NEURALGIA**

### **ABSTRACT:**

**Introduction:** Trigeminal neuralgia (TN) is a severe chronic disease characterized by lancinating pain and it is limited on one or more branches of the trigeminal nerve. The partial ligation model has been shown as an effectively simulate many of the characteristics of human neuropathic pain syndromes.

**Objectives:** To evaluate morphological changes in the trigeminal pathway in induced neuropathy by infraorbital nerve ligation (ION) in rats.

**Methods:** Wistar rats were used with 6 animals per group, being: C, TN and TN-Sham. TN was induced through ION constriction. The nociceptive threshold was measured through the use of analgesimeters in the region of the skin of the vibrissae (SV). The animals were euthanized and collected skin, ION, trigeminal ganglion (TG) and trigeminal spinal tract (ST - Sp5c region) on the 21st day after surgical procedure. Immunofluorescence was performed with DAPI, anti-PGP 9.5, anti-NeuN, anti-ATF-3, anti-c-Fos, anti-PBM antibodies.

**Results:** In the evaluation of mechanical nociception it was verify a reduction of the nociceptive threshold in the neuropathic group. In immunofluorescence, a significant increase of c-Fos expression was observed in the TN group in TG and ST, whereas the ATF-3 labeling showed an expressive increase only in TG. There was a significant increase in the expression of MBP in ION and of PGP 9.5 in VS only in the neuropathic group.

**Conclusion:** Morphological changes were observed along the nociceptive pathway, suggesting that they may be responsible for and perpetuating the neuropathic condition in the ION model of rats.

**Significance:** The recognition of alterations in the trigeminal nociceptive pathway is useful for the understanding of the onset and factors that maintain trigeminal pain, serving as a basis for the adoption of pharmacological and non-pharmacological therapies.

## 1 INTRODUÇÃO

A neuralgia do trigêmeo (NT) é a mais séria e mais comum dentre as neuralgias que afetam a região de cabeça e pescoço. É uma doença crônica, debilitante, caracterizada pela presença de dor paroxística e lancinante, semelhante a um choque elétrico, limitada a um ou mais ramos do nervo trigêmeo, em que a duração da dor pode chegar aos dois minutos, embora o ataque total possa consistir em numerosos espasmos de curta duração (Love et al, 2011). A NT tem maior incidência sobre o sexo feminino e acima da sexta década de vida. Na maioria dos casos, a crise de dor é abrupta e geralmente desencadeada por estímulos não dolorosos em regiões da face (alodínia). As zonas de gatilho no território de distribuição de V2 (ramo maxilar) e V3 (ramo mandibular) são mais comuns (Love et al. 2001). Muitas vezes os pacientes vivem com medo da dor, com hábitos diários interrompidos e qualidade de vida prejudicada, e normalmente se apresentam com maiores níveis de ansiedade e depressão (Macianskyte et al. 2011).

Estudos experimentais em animais vêm sendo realizados para a compreensão dos mecanismos de ativação da via nociceptiva. O modelo de constrição do nervo infraorbital (NIO) reproduz aspectos importante da neuralgia trigeminal, como o comportamento anormal relacionado a dor e alodínia mecânica (Xu et al 2008), e permite a avaliação de condições estritamente sensitivas sem interferências motoras. Entretanto ainda há a necessidade de melhor caracterização das alterações morfológicas que ocorrem ao longo da via trigeminal.

Estudos relatam que a injúria periférica em um nervo leva a alodinia ou hiperalgesia em humanos e animais (Gautron et al, 1990; Guilbald et al, 1990; Garrison et al, 1991; Bennett, 1993; Bennett, 1994; Woolf, 2001). A lesão promovida ao nervo é muitas vezes intratável e o conhecimento do desenvolvimento da doença ainda é pouco compreendido (Sounvoravong et al, 2004). Modelos desenvolvidos em animais, tais como o modelo de ligadura parcial do nervo isquiático (Garrison et al, 1991) e de lesão por constrição crônica do nervo infraorbital ou de transecção completa dos nervos infraorbitais, alveolar inferior ou lingual (Xu et al 2008) vem sendo utilizada para a compreensão dos mecanismos ativos na dor neuropática.

Nas lesões do sistema nervoso periférico (SNP) acontecem eventos que levam ao processo de regeneração, causando modificações estruturais e funcionais que levam a alterações de condução nervosa, induzindo a sensibilização central e periférica (Schwartzman et al. 2001; Nicholson, 2004).

O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar alterações morfológicas desde os tecidos periféricos até o tronco encefálico, na região do trato espinhal do trigêmeo

(Sp5c), local da primeira sinapse da via de nocicepção trigeminal, em modelo de neuropatia induzida por ligadura do NIO em ratos.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Animais

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (protocolo n°45/2015) e realizado de acordo com o Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. O experimento foi realizado em ratos Wistar machos (180-220g) que foram mantidos em sala com temperatura controlada ( $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo de luz 12h/dia e acesso *ad libitum* à água e alimento. Os animais foram divididos em grupos com 6 animais em cada, sendo eles: C (controle, ratos sem neuralgia ou intervenção cirúrgica), NT (ratos com neuralgia) e NT-Sham (ratos sem neuralgia, sem constrição do NIO).

### 2.2. Neuralgia trigeminal induzida por ligadura do NIO

Para a indução da NT foi realizada ligadura do nervo infraorbital. Os animais foram anestesiados com quetamina (10%) e xilasina (2%) na dose de 40-80 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente, por via intraperitoneal. Do lado esquerdo, após limpeza da pele do rato com iodo, foi feita uma pequena incisão linear paralela ao trajeto do NIO e acesso ao mesmo, duas amarras frouxas com fio inócuo de polipropileno 6-0, separadas uma da outra por aproximadamente 2 mm, foram feitas ao redor do nervo, o mais próximo possível da região caudal do NIO e do forame. Cuidados foram tomados para não ocluir a passagem do impulso nervoso, um espaçador de nylon com diâmetro de 0,5 mm foi colocado paralelamente ao nervo e retirado por deslizamento após a realização das amarras, assegurando uma folga constante e suficiente para diminuir o diâmetro do nervo e retardar, mas sem ocluir, a passagem do impulso nervoso e da vasculatura superficial, conforme descrito por Bennett e Xie (1988). No grupo NT-Sham, o NIO foi apenas exposto, sem realização de ligadura. A incisão foi suturada com fio de nylon 4-0 (Bennet e Xie 1988; Xu et al 2008). Os animais permaneceram em caixas plásticas isoladas por 24h após a cirurgia de indução e posteriormente foram novamente colocados juntos no mesmo grupo.

### 2.3. Teste nociceptivo - Hiperalgisia e alodínia mecânica

Os registros do limiar nociceptivo foram feitos nos dias 0 (registro do limiar basal, imediatamente antes da cirurgia), 3°, 7°, 10°, 14°, 18° e 21° (último registro e eutanásia dos animais) após indução da NT. O limiar de nocicepção do animal foi obtido através do registro da intensidade de força aplicada na região da almofada vibrissal do lado esquerdo, sendo realizados em triplicatas. Para isso, o aparelho Von Frey eletrônico (Electronic von Frey Digital Analgesymeter, Insight Instruments, São Paulo, SP, Brasil), que é um transdutor de

força que mede o limiar de nocicepção em gramas (g), foi aplicado perpendicularmente na região a ser avaliada. O avaliador foi previamente treinado para realizar o teste aplicando força de forma gradual até a obtenção de uma resposta reflexa do animal (ex. movimento de retirada de cabeça), automaticamente o estímulo foi interrompido e registrada a medida. Os animais foram submetidos a sessões de condicionamento ao teste de nocicepção mecânica por um período de 5 dias antes da indução da NT. Para realização do registro, os animais foram colocados em caixas plásticas individuais 20 minutos antes de iniciar os testes em ambiente com baixa iluminação.

#### **2.4. Imunofluorescência**

No 21º dia os animais foram anestesiados com quetamina (10%) e xilasina (2%) na dose de 100 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente, por via intraperitoneal e sacrificados por meio de perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% (60ml/animal) seguido de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (60ml/animal), os corpos foram decapitados e as seguintes estruturas foram dissecadas e coletadas: pele vibrissal, nervo infraorbital e gânglio trigeminal ipsilaterais à ligadura e trato espinhal trigeminal (região Sp5c). As amostras foram pós fixadas por 2 horas em PFA, crioprotetidas em solução sacarose 30% (p/v) em tampão fosfato a 4°C por 72h (onde a solução foi renovada com 1h, 24h, 48h). Posteriormente, os tecidos foram embebidos e emblocados em OCT-Tissue-Tek®, e armazenados em freezer -80°C até o corte e montagem das lâminas para os ensaios de imunofluorescência.

O material criopreservado a -80°C, foi posteriormente cortado em criostato (Leica® CM1100) à temperatura de -25°C na espessura de 8 µm e montado em lâminas silanizadas para imunohistoquímica (ImmunoSlide Easy Path®) para realização do protocolo de imunofluorescência.

O gânglio trigeminal e o subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo foram incubados com os anticorpos anti-ATF3 (Abcam®), anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology®) para marcar a expressão das proteínas correspondentes e com o anticorpo NeuN (conjugado com Alexa fluor 488 - Millipore®) para evidenciar os corpos celulares de neurônios.

Os cortes de nervos infraorbitais foram incubados com anti-PBM (Santa Cruz Biotechnology®) para evidenciar a bainha de mielina nas fibras nervosas.

Para evidenciar as fibras nervosas da pele foi feita imunofluorescência utilizando-se anticorpo anti-PGP 9.5 (Abcam®) e DAPI (Invitrogen®) para evidenciar núcleos celulares das células de Schwann e demais células adjacentes.

Dessa forma, os cortes histológicos foram secados em temperatura ambiente, fixados

por 2 min em álcool metílico (Metanol) P.A. (Sigma®), lavados em solução tamponada de fosfato (PBS), e imersos em tampão citrato 0,1M (pH 6,0), sob aquecimento a 95°C em forno de micro-ondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução de PBS e bloqueio das ligações inespecíficas com glicina (0,3M) em Albumina Sérica Bovina 5% (BSA) durante 30 min. Os cortes foram incubados “overnight” (4°C) com os anticorpos primários policlonais anti-ATF3, anti-c-Fos, anti-PBM anti-PGP 9.5. Depois de incubados overnight os cortes foram lavados e depois incubados por 90 minutos em soluções contendo espécies anticorpos específicos secundário Anti IgG para coelho conjugados a Alexa flúor 568, 594 ou 488 (Invitrogen®). O DAPI foi acrescentado ao final para evidenciar os núcleos celulares. Estudos de controle de imunomarcção foram realizados por omissão dos anticorpos primários (controle negativos). Para diferenciação de neurônios foi utilizado o anticorpo fluorescente NeuN (conjugado a Alexa flúor 488) por imunofluorescência direta. Após lavagens, todas as seções foram montadas em meio próprio e armazenadas em câmara escura a 4 °C até a leitura em microscópio confocal (Zeis® LSM-710).

## 2.5. Análise dos dados

Para avaliar a normalização dos dados foi utilizado teste de Shapiro-Wilk, onde os dados considerados paramétricos foram analisados através do teste ANOVA one-way, para comparação das médias entre variáveis dos grupos. Foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias de Levene, para determinar o teste pos-hoc adequado, Tukey ou Games-Howell. O nível de significância estatística utilizado foi de  $p < 0,05$  e todas as análises foram efetuadas com recurso do software IBM® SPSS® statistics 20 e gráficos elaborados usando os recursos do software GraphPad Prism® 6.0.

A quantificação da área marcada com ATF3 e c-Fos nas fotomicrografias foram feitas demarcando-se a área de interesse (onde se encontravam os corpos celulares) nos gânglios trigeminais e no subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo, excluindo-se a área restante. Afim de definir o nível de expressão desses marcadores, depois de isolada a área de interesse, foi realizada a mensuração das áreas marcadas ( $\mu\text{m}^2$ ) pela maior saturação de cor associada (vermelha) em razão da área total demarcada também pela maior saturação da cor associada à marcação do NeuN (Verde), expressada em percentagem (%).

A quantificação da marcação de PBM nas fotomicrografias foi feita pela obtenção da densidade de marcação no histograma (pixels) em razão da área total das fibras nervosas

demarcadas pela maior saturação da cor associada (vermelha) expressados em pixels/ $\mu\text{m}^2$ . Para isso, foi utilizado um software de livre acesso Fiji<sup>®</sup> ImageJ<sup>®</sup> (versão 1.51k).

As marcações em PGP 9.5 das fibras nervosas na pele, foram obtidas em microscópio laser de varredura confocal (Zeiss<sup>®</sup> LSM-710) em três dimensões (3D) pela varredura em camadas sequenciadas, e depois sobrepostas, para formar uma imagem de duas dimensões (2D). Devido as características e disposição das terminações nervosas, que passam entre as células que compõem as camadas da pele, atravessado diversos planos, foi necessário executar uma varredura do microscópio confocal dos cortes de tecido em diversos focos (planos) para formar uma imagem em três dimensões (3D) que possibilitasse a visualização de maior quantidade de secções das fibras nervosas. As imagens 3D foram usadas para formar imagens em duas dimensões (2D) pela sobreposição de imagens.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Hipernocicepção mecânica:**

No dia 0 (imediatamente antes dos procedimentos cirúrgicos), o limiar nociceptivo basal dos animais em todos os grupos não diferiram. No entanto, no 3º e 7º dias após a indução da NT, houve uma redução significativa do limiar nociceptivo dos grupos NT e NT-Sham em relação ao grupo controle, sendo que o grupo NT manteve essa redução por todo período experimental. A partir do 10º dia houve o retorno do limiar nociceptivo ao valor basal no grupo NT-Sham, se mantendo até o 21º dia não diferindo estatisticamente do grupo controle (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ; Fig 1).

#### **3.2. Imunoexpressão de c-Fos em gânglio trigeminal e Trato espinhal (Sp5c)**

Houve aumento significativo da expressão de c-Fos tanto em gânglio trigeminal (Fig. 2A e 2B) como em trato espinhal (Sp5c) (Fig. 3A e 3B) no grupo NT quando comparado ao grupo controle. O grupo NT-Sham não diferiu estatisticamente do grupo controle em ambas as marcações (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **3.3. Imunoexpressão de ATF-3 em gânglio trigeminal e trato espinhal (Sp5c)**

Houve aumento significativo da expressão de ATF-3 em gânglio trigeminal no grupo NT (Fig. 4A e 4B) quando comparado ao grupo controle. No entanto, quanto a marcação em trato espinhal no grupo NT, não houve alterações, não diferindo estatisticamente do grupo controle, assim como o grupo NT-Sham (Fig. 5A e 5B) (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **3.4. Imunoexpressão de PBM em NIO**

Em relação ao grupo controle, houve um aumento significativo da expressão de PBM no grupo NT, enquanto que grupo NT-Sham não diferiu estatisticamente (Fig. 6A e 6B; ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **3.5. Imunoexpressão de PGP9.5 em pele vibrissal**

Foi observado pelas imagens obtidas, analisando de forma descritiva, uma quantidade significativa de fibras nervosas no grupo controle (setas amarelas), enquanto no grupo neuropático, o número de fibras nervosas aparentou estar reduzido em relação ao grupo controle.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos a caracterização da ativação nociceptiva tanto a nível periférico como central, podendo ser observado todo o percurso nervoso.

Nesse estudo, o teste mecânico de hipernocicepção mostrou que houve uma redução significativa do limiar nociceptivo nos animais neuropáticos, mesmo após o período de dor inflamatória decorrente do procedimento cirúrgico nos primeiros 7 dias o limiar manteve-se abaixo da medida basal, indicando que o animal apresenta uma percepção aumentada da dor. Tais resultados sustentam os achados de que a ligadura do NIO induz a neuropatia persistente do nervo trigêmeo.

A lesão de um nervo periférico não só produz sinais comportamentais profundos de dor persistente, mas também ativa vias centrais de dor. A lesão nervosa e tecidual decorrente da doença leva à liberação de mediadores (como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) que sensibilizam as terminações nervosas periféricas, acarretando alterações neuroquímicas e fenotípicas e aumento da excitabilidade dos neurônios aferentes do gânglio trigeminal e dos núcleos do trigêmeo (sensibilização central). Em adição, as terminações nervosas lesadas liberam neuropeptídeos vasoativos, perpetuando a inflamação neurogênica e a sensibilização periférica. (De Corato et al 2011). Além disso, ocorrem alterações nas vias de modulação descendentes que alteram os limiares e a percepção da dor (Jarvis e Boyce-Rustay, 2009).

Para avaliar a ativação das vias nociceptivas trigeminais, periférica e centralmente, em condições de neuralgia, foram realizadas a imunomarcagem por fluorescência do gene imediato c-Fos, que se expressa em várias estruturas do SNP, como nos gânglios, e do SNC (Nestler, 2012), envolvidas no processo nociceptivo, incluindo medula espinhal, substância periaquedutal mesencefálica, núcleos parabraquiais e tálamo após estimulação dolorosa (Ahmand, 2002). Baseado neste contexto, nossos resultados mostraram um aumento significativo da expressão de c-Fos no gânglio trigeminal e no trato espinhal trigeminal no grupo neuropático, mostrando a ativação das vias nociceptivas e condução de estímulos dolorosos. Esse achado é confirmado com os resultados obtidos nos testes de avaliação do limiar nociceptivo, que se mostravam reduzidos, evidenciando uma maior resposta nociceptiva da via trigeminal.

O ATF3 é considerado um importante marcador tanto de lesão neuronal como da capacidade regenerativa neuronal periférica (Linda et al, 2011, Hunt, et al, 2012) e por não se expressar significativamente em níveis basais nas células não expostas a agressões (Boespflug et al, 2017). As análises de imunofluorescência de ATF3 para verificação de injúria neuronal no nosso estudo, mostraram uma elevação na expressão de ATF3 nos gânglios trigeminais do

grupo neuropático. Estes resultados demonstraram, a princípio, que a ligadura do nervo infraorbital levou a um dano periférico, seguido de uma resposta celular. Apesar do ATF3 expressar-se em níveis elevados no gânglio trigeminal em animais neuropáticos, o mesmo não aconteceu na avaliação de sua expressão no subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo, onde seus níveis mostraram-se basais, semelhantemente ao grupo controle e ao grupo com cirurgia *sham*. Tal resultado confirma os achados da literatura que mostraram que o ATF3, apesar de se expressar a nível central no corno dorsal da medula espinhal após injúria periférica (Seijffers et al, 2006; Tsujino et al, 2000), não se expressa no subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo nas mesmas condições de injúria periférica (Latrémolière, et al, 2008). Visto que a via trigeminal comporta-se de maneira distinta, especula-se a ocorrência de maior capacidade de reparo nervoso periférico que a nível de sistema nervoso central.

Para verificar a integridade e regeneração axonal no NIO, foi analisada a expressão da proteína constitutiva PBM da bainha de mielina por imunofluorescência. Nesta análise, foi verificado um aumento significativo da expressão de PBM no grupo neuropático. O aumento de PBM, após 21 dias da injúria neuronal, observado em nossos resultados, corroboram com dados achados na literatura, que mostram que as células de Schwann diminuem e, em seguida, interrompem totalmente a sua síntese de mielina logo nos 2 primeiros dias após injúria (Vargas; Barres 2007), entrando em novo ciclo celular, onde proliferam e realizam a remoção da mielina (Pellegrino et al., 1986; Liu et al., 1999; Murinson et al., 2005; Vargas; Barres 2007), sofrendo uma remodelagem e retomando a produção de mielina no local da lesão, aumentando consideravelmente a quantidade de PBM (Harrisingh et al., 2004, Câmara et al, 2015), estimulada pela sinalização axonal (Gupta et al, 1993; Câmara et al, 2015). Tal aumento de expressão de PBM evidencia a tentativa neuronal de reparo axonal. A avaliação e quantificação da PBM são importantes ferramentas na avaliação de injúria axonal, bem como da capacidade de reparo.

A expressão da PBM pode ser um parâmetro do grau da velocidade da degeneração ou da regeneração do nervo, dependendo do tempo pós-injúria em que é avaliada (Gupta et al., 1993; Câmara, 2015), visto que, após injúria neural, verificamos uma diminuição da expressão de PBM, devido a reabsorção da mielina, seguida de uma retomada de sua síntese mais tardiamente (Garbay et al., 2000).

Tais achados se confirmam com nossos resultados de marcação de PGP 9.5, usado para identificar a presença de terminações nervosas nos cortes de pele vibrissal, onde encontramos, apesar de uma avaliação apenas qualitativa, uma diminuição na quantidade de terminações nervosas chegando no local de inervação do nervo infraorbital. Dessa forma,

apesar da diminuição da quantidade de terminações, há persistência de hiperexcitabilidade da via nociceptiva, demonstrando a importância e influência das alterações morfológicas sobre a funcionalidade da via. Mesmo com a redução de terminações, o quadro neuropático induzido pelo modelo suficiente para causar disparos de dor neuropática (hiperalgesia e alodínia).

Dessa forma pode-se dizer que o modelo de neuralgia trigeminal por constrição do NIO leva a alterações morfológicas ao longo da via trigeminal, sugerindo que as mesmas podem ser causadoras e perpetuadoras do quadro neuropático e que tais alterações nos auxiliam na compreensão do surgimento e dos fatores mantenedores da dor trigeminal, servindo de embasamento para adoção de terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas.

## **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

Todos os autores contribuíram para realização do estudo, discutiram os resultados e comentaram o manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito.

## **Conflito De Interesse**

Não há conflitos de interesse.

## LEGENDAS

Figura 1 - Representação da evolução temporal do limiar nociceptivo desde o limiar basal e todo período de indução da neuralgia. \*, Diferença em relação ao controle (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p<0,05$ ).

Figura 2A - Representação da quantificação da expressão de c-Fos pela área marcada em gânglio trigeminal. \*, a expressão de c-Fos apresenta-se aumentada no grupo neuropático em relação ao controle (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p<0,05$ ).

Figura 2B - Fotomicrografias de gânglio trigeminal mostrando em verde: NeuN (corpo celular), em Vermelho: c-Fos e em Laranja: fusão dos canais, para todos os grupos (Magnitude 200x).

Figura 3A - Representação da quantificação da expressão de c-Fos pela área marcada em Trato espinhal trigeminal. \*, a expressão de c-Fos apresenta-se aumentada no grupo neuropático em relação ao controle (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p<0,05$ ).

Figura 3B - Fotomicrografias subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo mostrando em Verde: NeuN (corpo celular), em Vermelho: c-Fos e em Laranja: fusão dos canais, para todos os grupos (Magnitude 200x).

Figura 4A - Representação da quantificação da expressão do fator de ativação de transcrição (ATF3) pela área marcada em gânglio trigeminal. \*, a expressão de ATF3 apresenta-se aumentada no grupos neuropático em relação ao controle (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p<0,05$ ).

Figura 4B - Fotomicrografias de gânglio trigeminal mostrando em verde: NeuN (corpo celular), Vermelho: Fator de ativação de transcrição – ATF3 e em Laranja: fusão dos canais, para todos os grupos (Magnitude 200x).

Figura 5A - Representação da quantificação da expressão do fator de ativação de transcrição (ATF3) pela área marcada em Trato espinhal trigeminal. \*, a expressão de ATF3 nos grupos não difere do controle (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p<0,05$ ).

Figura 5B - Fotomicrografias de subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo, em Verde: NeuN (corpo celular), Vermelho: Fator de ativação de transcrição – ATF3 e em Laranja: fusão dos canais, para todos os grupos (Magnitude 200x).

Figura 6A - Representação da quantificação da expressão de PBM pela densidade da marcação em nervo infraorbital. \*, a expressão de PBM apresenta-se aumentada no grupo neuropático em relação ao controle (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Figura 6B - Fotomicrografias de fibras nervosas de nervo infraorbital mostrando em Vermelho: PBM, para todos os grupos (Magnitude 200x)

Figura 7 - Fotomicrografias de pele vibrissal mostrando em Vermelho: PGP 9.5 e em Azul: DAPI (núcleos celulares), para grupos controle e neuropático. Setas amarelas: terminações nervosas (Magnitude 100x).

## REFERÊNCIAS

- Ahmad, A. H., Ismail, Z. (2002). C-fos and its Consequences in Pain. *MJMS*, 9, 3.
- Bennett, G. J., Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33, 87-107.
- Bennett, G. J. (1993). An animal model of neuropathic pain: a review. *Muscle & nerve*, 16, 1040-1048.
- Bennett, G. J. (1994). Hypotheses on the pathogenesis of herpes zoster—associated pain. *Annals of neurology*, 35.
- Boespflug, N. D., Kumar, S., McAlees, J. W., Phelan, J. D., Grimes, H. L., Hoebe, K., Karp, C. L. (2014). ATF3 is a novel regulator of mouse neutrophil migration. *Blood*, 123, 2084-2093.
- Câmara, C. C., Araújo, C. V., de Sousa, K. K. O., Brito, G. A., Vale, M. L., da Silva Raposo, R., Oriá, R. B. (2015). Gabapentin attenuates neuropathic pain and improves nerve myelination after chronic sciatic constriction in rats. *Neuroscience letters*, 607, 52-58.
- De Corato, A., Lisi, L., Capuano, A., Tringali, G., Tramutola, A., Navarra, P., & Russo, C. D. (2011). Trigeminal satellite cells express functional calcitonin gene-related peptide receptors, whose activation enhances interleukin-1 $\beta$  pro-inflammatory effects. *J. Neuroimmunol*, 237, 39-46.
- Garbay, B., Heape, A. M., Sargueil, F., Cassagne, C. (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol*, 61, 267-304.
- Garrison, C. J., Dougherty, P. M., Kajander, K. C., Carlton, S. M. (1991). Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res Rev*, 565, 1-7.
- Gautron, M., Jazat, F., Ratinahirana, H., Hauw, J. J., Guilbaud, G. (1990). Alterations in myelinated fibres in the sciatic nerve of rats after constriction: possible relationships between the presence of abnormal small myelinated fibres and pain-related behaviour. *Neurosci. Lett*, 111, 28-33.
- Gupta, S. K., Pringle, J., Poduslo, J. F., Mezei, C. (1993). Induction of myelin genes during peripheral nerve remyelination requires a continuous signal from the ingrowing axon. *J. Neurosci. Res*, 34, 14-23.
- Guilbaud, G., Benoist, J. M., Jazat, F., Gautron, M. (1990). Neuronal responsiveness in the ventrobasal thalamic complex of rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *J. Neurophysiol*, 64, 1537-1554.

Harrisingh, M. C., Perez-Nadales, E., Parkinson, D. B., Malcolm, D. S., Mudge, A. W., Lloyd, A. C. (2004). The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation. *The EMBO journal*, 23, 3061-3071.

Hunt, D., Raivich, G., Anderson, P. N. (2012). Activating transcription factor 3 and the nervous system. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5.

Boyce-Rustay, J. M., Jarvis, M. F. (2009). Neuropathic pain: models and mechanisms. *Current pharmaceutical design*, 15, 1711-1716.

Latrémolière, A., Mauborgne, A., Masson, J., Bourgoin, S., Kayser, V., Hamon, M., Pohl, M. (2008). Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J Neurosci*, 28, 8489-8501.

Lindå, H., Sköld, M. K., Ochsmann, T. (2011). Activating transcription factor 3, a useful marker for regenerative response after nerve root injury. *Front Neurol.*, 2.

Liu, L., Lioudyno, M., Tao, R., Eriksson, P., Svensson, M., Aldskogius, H. (1999). Hereditary Absence of Complement C5 in Adult Mice Influences Wallerian Degeneration, but not Retrograde Responses Following Injury to Peripheral Nerve. *J Peripher Nerv Syst*, 4, 123-133.

Love, S., Coakham, H. B. (2001). Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis. *Brain*, 124, 2347-2360.

Macianskytė, D., Januzis, G., Kubilius, R., Adomaitiene, V., & Sciupokas, A. (2011). Associations between chronic pain and depressive symptoms in patients with trigeminal neuralgia. *Medicina*, 47, 386-392.

Murinson, B. B., Archer, D. R., Li, Y., Griffin, J. W. (2005). Degeneration of myelinated efferent fibers prompts mitosis in Remak Schwann cells of uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci*, 25, 1179-1187.

Nestler, E. J. (2012) Mechanisms of transcription of drug addiction. *Clinical Psychopharmacologic Neuroscience*, 10, 136-143.

Nicholson B. D. (2004). Evolution and treatment of central pain syndromes. *Neurology*, 62, 30-36.

Pellegrino, R. G., Politis, M. J., Ritchie, J. M., Spencer, P. S. (1986). Events in degenerating cat peripheral nerve: induction of Schwann cell S phase and its relation to nerve fibre degeneration. *J Neurocytol.*, 15, 17-28.

Schwartzman, R. J., Grothusen, J., Kiefer, T. R., Rohr, P. (2001). Neuropathic central pain: epidemiology, etiology, and treatment options. *JAMA Neurol*, 58, 1547-1550.

Seiffers, R., Allchorne, A. J., Woolf, C. J. (2006). The transcription factor ATF-3 promotes neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci*, 32, 143-154.

Sounvoravong, S., Nakashima, M. N., Wada, M., Nakashima, K. (2004). Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol*, 484, 217-223.

Tsujino, H., Kondo, E., Fukuoka, T., Dai, Y., Tokunaga, A., Miki, K., Noguchi, K. (2000). Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol. Cell. Neurosci*, 15, 170-182.

Vargas, M. E., Barres, B. A. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow?. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, 153-179.

Woolf, C. J., Max, M. B. (2001). Mechanism-based Pain Diagnosis Issues for Analgesic Drug Development. *Anesthesiology*, 95, 241-249.

Xu, M., Aita, M., & Chavkin, C. (2008). Partial infraorbital nerve ligation as a model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural, and glial reactions. *J. Pain*, 9, 1036-1048.

FIGURA 1

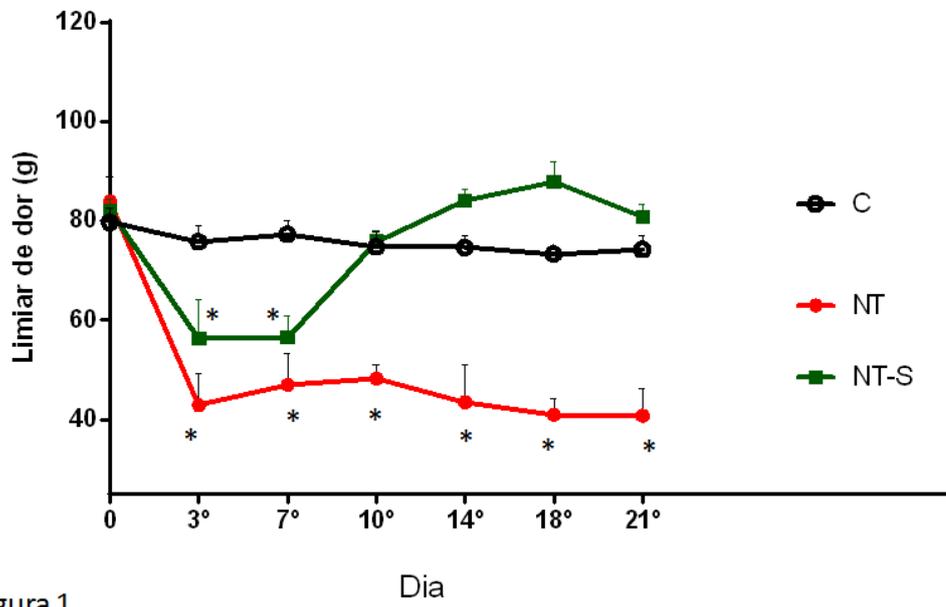


Figura 1

FIGURA 2A e 2B

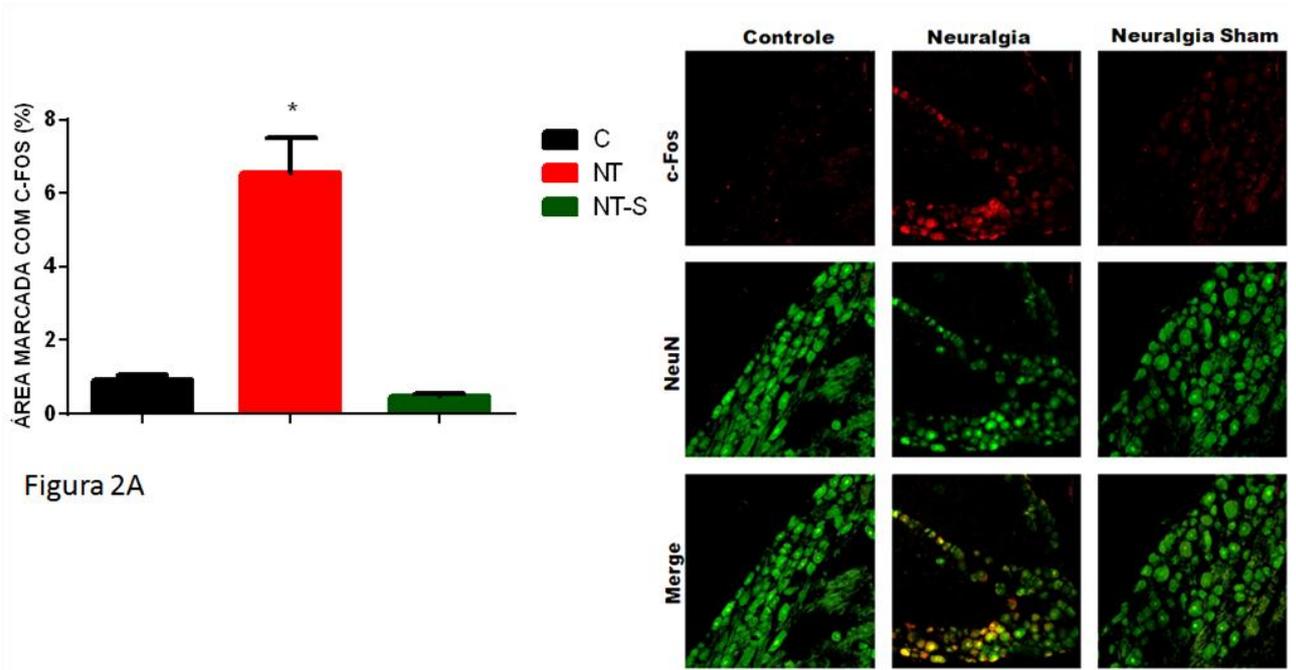


Figura 2A

Figura 2B

FIGURA 3A e 3B

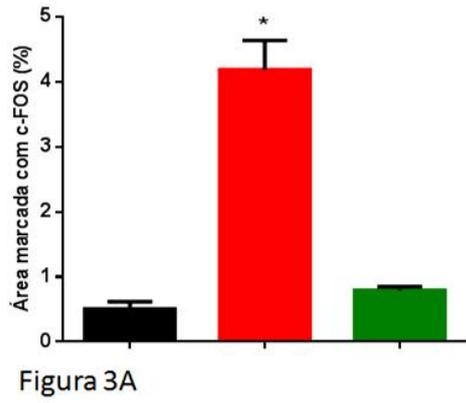


Figura 3A

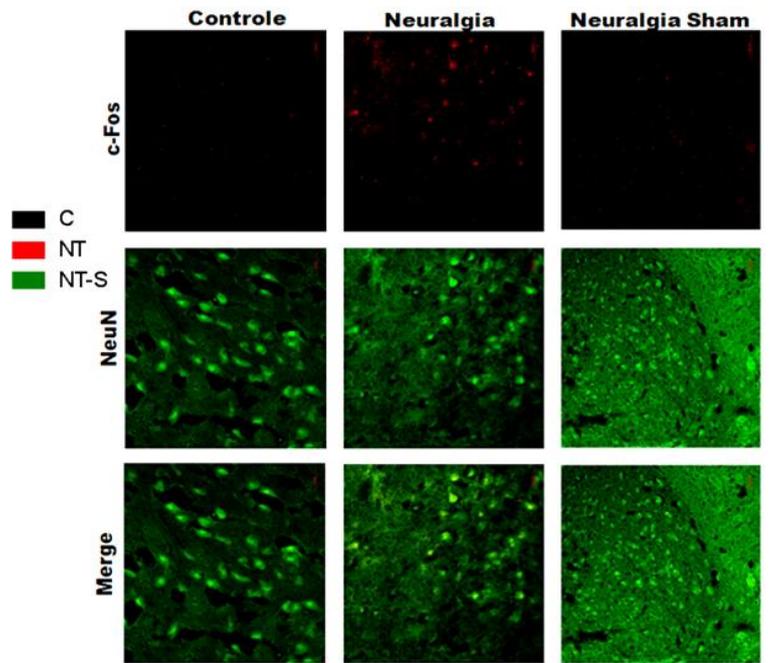


Figura 3B

FIGURA 4A e 4B

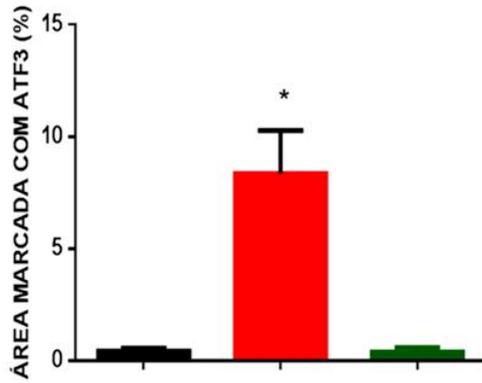


Figura 4A

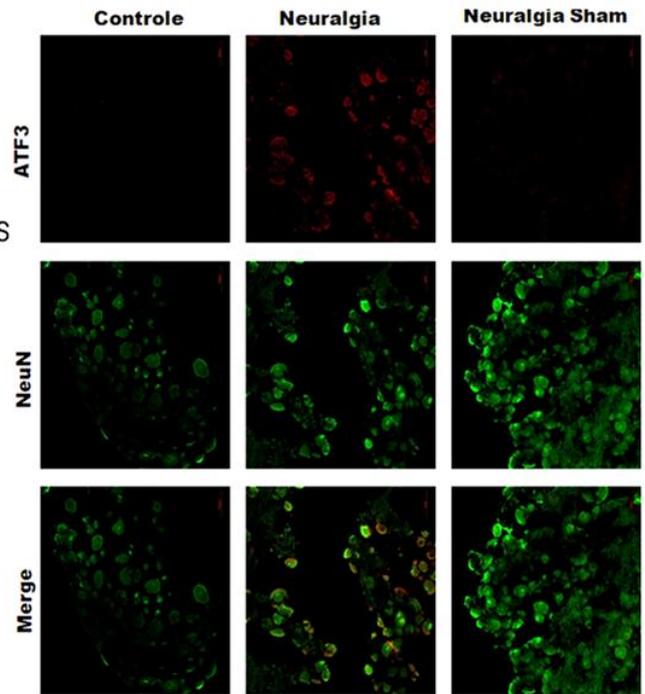


Figura 4B

FIGURA 5A e 5B

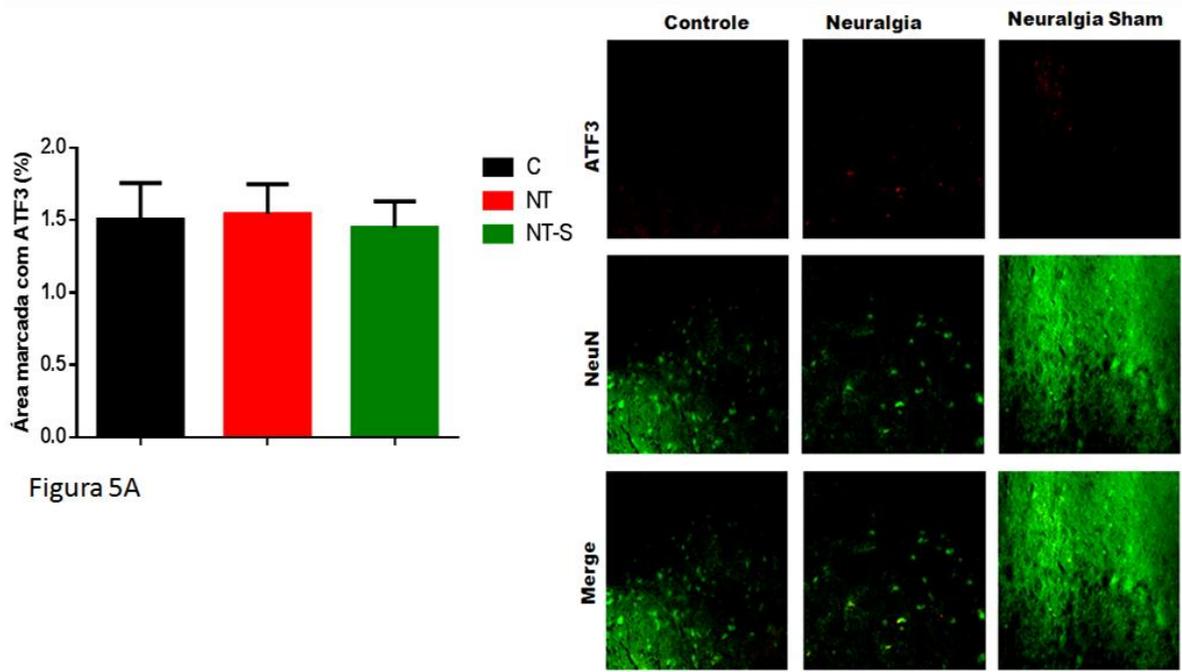


Figura 5A

Figura 5B

FIGURA 6A e 6B

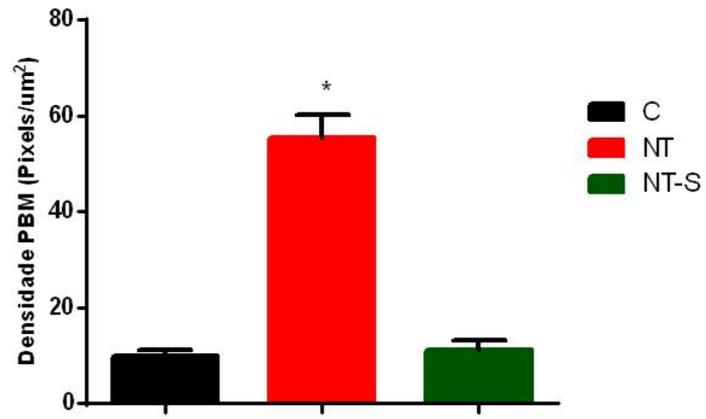


Figura 6A

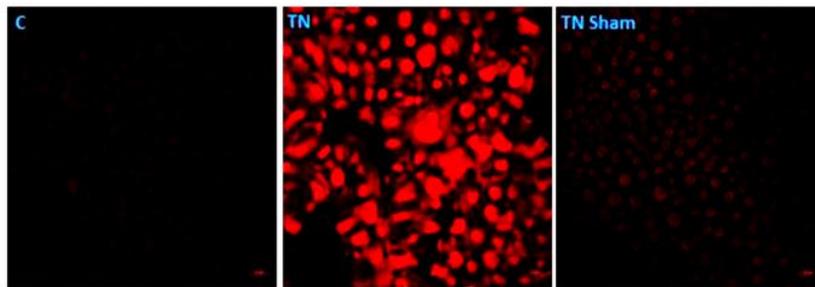
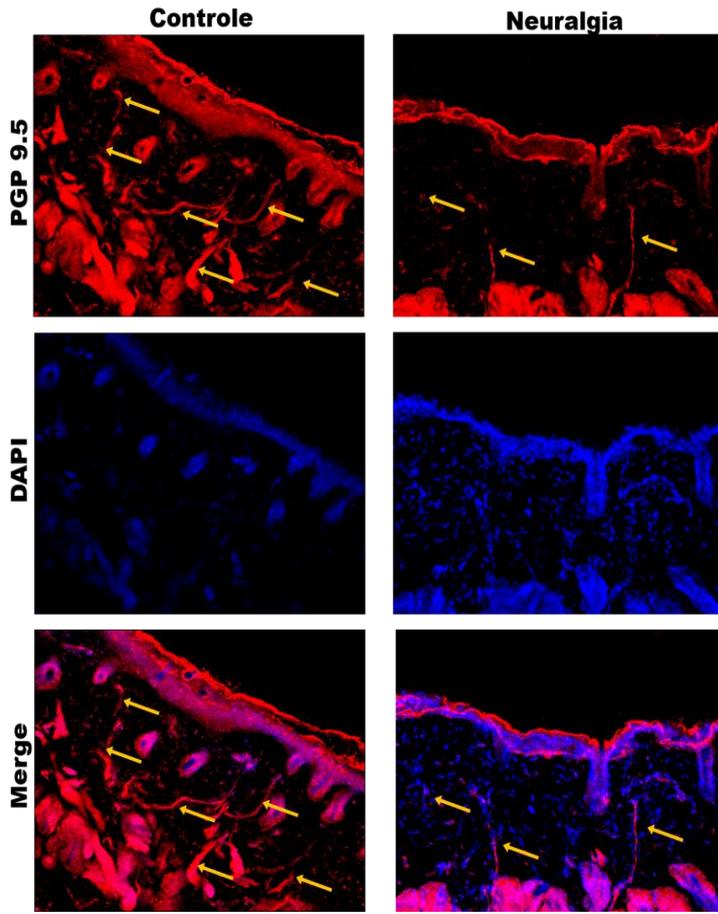


Figura 6B

FIGURA 7



**ANEXO A – Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC)**



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICAS E CENTRAIS NA NEURALGIA DO TRIGÊMEO EM RATOS COM HIPOTIREOIDISMO", protocolo nº45/2015, sob responsabilidade do Profa. Dra Mariana Lima Vale, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 11 de novembro de 2015.

Vigência do projeto	20/05/2015 a 04/10/2017
Espécie/Linhagem	Ratos Heterogênico Wistar
Nº de Animais	96
Peso/Idade	180g – 02 meses
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 19 de novembro de 2015

  
Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sigepe: 1528734

**ANEXO B** – Publicação de resultados parciais como “Short communication” na Revista The FASEB Journal (A1, JCR 5,489).

## TRIGEMINAL NEURALGIA IN RATS WITH HYPOTHYROIDISM: A MORPHOLOGICAL STUDY

Oswaldo P. da Costa Sobrinho<sup>1</sup>, Helson Freitas da Silveira<sup>2</sup>,  
Lúza Clertiani Alves Vieira<sup>1</sup>, Kalina Kelma Oliveira de Sousa<sup>1</sup>,  
Diego Bernarde Souza Dias<sup>1</sup>, Delane Viana Gondim<sup>2</sup> and Mariana Lima Vale<sup>3</sup>

Author Affiliations

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

<sup>2</sup>Morphology Department, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

<sup>3</sup>Pharmacology Department, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

### Abstract

Thyroid hormones (THs) are important growth and development factors, mainly of the Central Nervous System (CNS). The lack of THs decreases the neuronal volume, the number of cells of the glia and may causing defects in myelination, which includes the spinal tract of the trigeminal nerve. Hypothyroidism (HT) is associated with chronic peripheral lesion in rats, depressing neuronal excitability with absence of sensory potentials. Previously, our lab research group verified that rats with HT have a higher nociceptive threshold when stimulated in the infra-orbital region. The aim of this study was to evaluate the peripheral morphological changes in the trigeminal pathway in a HT model induced by propylthiouracil (PTU) drug in rats. 72 male Wistar rats (180–220 g), originating from the Central Animal Facility of the Federal University of Ceará – Brazil, kept at 22 °C, by day/night cycle – 12/12 h, with water and food *ad libitum*. The rats were divided into 6 groups: control (C), Trigeminal Neuralgia (TN), TN Sham, HT, HT+TN, HT+TN Sham. The

« Previous | Next Article »  
Table of Contents

### This Article

April 2017  
The FASEB Journal  
vol. 31 no. 1 Supplement  
744.7

» Abstract

Article Usage Stats

Article Usage Statistics

Classifications

Anatomy  
Neurobiology: Neuronal  
and Spinal Cord  
Degeneration, Repair and  
Regeneration

Services

Email this article to a  
colleague  
Alert me when this article is  
cited  
Alert me if a correction is  
posted  
Similar articles in this journal  
Download to citation  
manager  
[© Get Permissions](#)

Google Scholar

Articles by da Costa  
Sobrinho, O. P.  
Articles by Vale, M. L.

PubMed

Articles by da Costa  
Sobrinho, O. P.

## ANEXO C – Normas de publicação da revista European Journal of Pain



### Author Guidelines

We would like to inform our authors that we now detect plagiarism easily. The journal to which you are submitting your manuscript employs the CrossCheck plagiarism screening system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

### Ethical policy and guidelines

*European Journal of Pain* encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the [International Committee of Medical Journal Editors](#).

*European Journal of Pain* will not consider papers that have been accepted for publication or published elsewhere. Copies of existing manuscripts with potentially overlapping or duplicative material should be submitted together with the manuscript, so that the Editors can judge suitability for publication. The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds.

**Please read the Ethical Policies of European Journal of Pain**

### Preprint Servers

*European Journal of Pain* will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Authors may also post the submitted version of their manuscript to non-commercial servers at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

### Encourages Data Sharing

*European Journal of Pain* encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

## 1. OVERVIEW

Table of content of the European Journal of Pain:

1. Editorials and Commentaries
2. Position Papers and Guidelines
3. Reviews
4. Original Research
5. Letters-to-the-Editor

Prior to submission, please ensure that your manuscript is in accordance with the author guidelines below.

Articles must be submitted online via the *European Journal of Pain* (EJP) Editorial Manager Site -

<http://www.editorialmanager.com/eurjpain> (see Section 3).

Any queries regarding the scope of the journal, the preparation of manuscripts or the submission of manuscripts may be sent to the Editorial Office at [ejp@meditos.de](mailto:ejp@meditos.de)

## 2. ARTICLE TYPES AND CONTENT

EJP invites the following types of submission:

### Original Articles

Original Articles are the journal's primary mode of communication.

Original articles must include a structured abstract including at the end a statement "Significance", indicating the main aspects where this work adds significantly to existing knowledge in the field, and if appropriate to clinical practice. The significance statement should be both attention-grabbing and rigorously in line with the contents of the full article ' (see Section 4).

### Review Articles

The journal aims to publish concise, topical, high-quality Review Articles of recent advances in laboratory or clinical research. Review Articles may be solicited by the Editor-in-Chief or may be submitted by authors. Any topic will be considered, but priority will be given to those addressing a major current problem and those with up-to-date literature reviews. All Review Articles are subject to peer-review.

Review articles must include a structured abstract including at the end a statement "Significance" in answer to the question 'what does this study add?' (see Section 4). Submission of a completed [PRISMA checklist](#) is required for all systematic reviews/meta-analyses.

### Short Communications

Short Communications typically describe completed laboratory or clinical work. The guidelines for the preparation of Short Communications are the same as those for Original Articles, as far as applicable. The abstract is limited to 250 words and the body of the article should not exceed three printed pages. Full length articles are preferred and Short Communications will only be accepted if they are of broad interest. Generally, no pilot studies or preliminary results will be accepted.

### Commentaries

Commentaries may provide opinion on published findings or on topics pertinent to the community of pain practitioners and researchers. Commentaries are typically commissioned by the Editors.

However, suggestions for such articles are welcomed and should be directed to the Editorial Office. A commentary on a paper accepted or already published by *EJP* must cite the primary article.

### Letters to the Editor

Letters to the Editor may be in response to issues arising from recently published articles, or as an exception, short, free-standing pieces expressing an opinion. Letters to the Editor should be formatted in one continuous section and should not exceed one printed page (800 words and 10 references). All letters are subject to peer-review.

Letters in response to a previously published article must cite the original article. At the Editors' discretion, a letter may be sent to authors of the original paper for comment, and both letter and reply may be published together.

### Randomized Controlled (Clinical) Trials

Manuscripts reporting randomised controlled trials [RCTs] must follow the [CONSORT](#) statement. RCTs will not be considered by *EJP* without submission of a completed [CONSORT checklist](#). In addition, authors should consider describing the outcome measures following the [IMMPACT](#) recommendations

(Dworkin et al., *Pain* 2005:113;9–19). For clinical trials the Clinical Study Registration Numbers has to be given. Please add this information at the end of your manuscript, before the reference list.

#### **Qualitative Studies**

While *EJP* has a strong focus on quantitative research, qualitative studies are also published. However, qualitative reports will only be considered for publication if they address research questions which are new or have not been extensively addressed in the empirical-quantitative literature. The findings must provide new insights..

#### **Open Label Studies**

Open label studies are occasionally considered if the topic is particularly interesting and a controlled study was impracticable.

#### **Translations of Questionnaires**

Translations of questionnaires into another language will not be considered for publication except if the study provides information and insights that go beyond the issue of translation and are of interest for international readers. Such data include for example comprehensive validity analyses including factorial validity, divergent and convergent validity or findings with regard to the clinical usefulness of a particular questionnaire.

#### **Studies on Health Economics**

Generally this journal does not publish papers on economical aspects of particular forms of pain treatments.

#### **Case reports**

Single case reports are very rarely published, series of case reports might be published if they are of broad interest.

#### **Audits**

Audits are not published in the European Journal of Pain.

### **3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS**

All submissions should be made online at the *EJP* Editorial Manager site -

<http://www.editorialmanager.com/eurjpain>. New users will be required to register and create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Centre.

### **4. PREPARATION OF MANUSCRIPTS**

Manuscripts must be written in English.

Manuscript text must be saved in Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf). Please do not submit text in PDF format (.pdf).

Due to space restrictions and a better readability papers generally should not exceed ten typeset pages (780 words/page, 32 references/page, including figures and tables). *EJP* can publish additional material as "supporting material" with a special link guiding from the manuscript to this material.

Authors are encouraged to take advantage of the online-only publication option.

Suggestions for the cover inset are invited. The illustration may be from a manuscript accepted for publication in the European Journal of Pain.

#### **Manuscript Structure and Word Count**

##### 1) Manuscript

- Title page (see further details below)
- Abstract (should not exceed 250 words, see further details below)

- Text
    - o Introduction (no subheadings, should not exceed 500 words)
    - o Methods (or Literature Search Methods for Review Articles)
    - o Results
    - o Discussion and conclusions (should not exceed 1500 words)
  - Acknowledgements
  - Author contributions (see Section 6)
  - References (limited to 80 for original manuscripts)
  - Legends for illustrations and tables
- 2) Tables (to be uploaded as separate files)
  - 3) Figures (to be uploaded as separate files)
  - 4) Supporting material (additional material that will be published online-only, to be uploaded separately, see further details below)

### Title Page

The title page should give:

- 1) The title of the article. Titles should be short and should not contain acronyms
- 2) A running head not exceeding 50 characters
- 3) The authors' names (initial(s) of first name(s) and last name of each author)
- 4) The names of the institutions at which the research was conducted, clearly linked to respective authors
- 5) The name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence
- 6) The category for which the manuscript is being submitted (original article, review, short communication)
- 7) A statement of all funding sources that supported the work
- 8) Any conflicts of interest disclosures
- 9) A statement "Significance", indicating the main aspects where this work adds significantly to existing knowledge in the field, and if appropriate to clinical practice. The significance statement should be both attention-grabbing and rigorously in line with the contents of the full article. It should not exceed 50 words and will be added to the end of the abstract at the time of typesetting. It does not count to the abstract's word limit (250 words).

### Abstract

The abstract should not exceed 250 words and should describe the background, the aims, the methods, the results and the conclusions reached. It should contain only standard abbreviations and no references. The short statement "Significance" (see above) needs to be added at the end of the abstract, giving some information about what this study/this review adds, what are the new findings (max. 40 words). For *Original Manuscripts* the following subheadings are required:

- Background
- Methods
- Results
- Conclusions

For *Reviews* the following subheadings are required:

- Background and Objective
- Databases and Data Treatment

- Results
- Conclusions

The statement "Significance" that has to be given on the title page will be added at the end of the abstract at the time of typesetting. It does not count to the abstract's word limit (250 words).

### Acknowledgements

The acknowledgements section should specify acknowledgement of technical help, but no sources of financial and material support. These should be given in the "Funding Sources" on the Title page.

### Author Contributions

Authors are required to include a statement of responsibility at the end of their manuscript's text that specifies the contribution of every author (see Section 6). Please state that all authors discussed the results and commented on the manuscript.

### References

In the text: references should be cited in parentheses at the appropriate point in the text by author(s) and year in chronological order, e.g., (Mustola, 1996; Baer, 1997; Mustola and Baer, 1998; Mustola et al., 1999). If two or more references with the same first author and year are cited, use lower-case letters a, b, etc., after the year both in the text and in the reference list.

In the reference list: references to cited materials should be listed in alphabetical order at the end of the article. Please use Index Medicus abbreviations for journal titles. Include all authors. Whenever the author list in a reference exceeds 8 authors, please keep the first 5 names then add "et al".

Example for an article in a periodical:

De Peuter, S., Van Diest, I., Vansteenwegen, D. (2011). Understanding fear of pain in chronic pain: Interoceptive fear conditioning as a novel approach. *Eur J Pain* 15,889–894.

Example for a chapter in a book:

Janes, R., Saarto, T. (2010). Oncologic therapy in cancer pain. In *Evidence-Based Chronic Pain Management*, C. Stannard, E. Kalso, J. Ballantyne, eds. (Oxford: Wiley-Blackwell) pp. 311–326.

Example for a book:

Van Zundert, J., Patijn, J., Hartrick, C. (2011). *Evidence-based Interventional Pain Practice* (Oxford: Wiley-Blackwell).

Citing and listing of Web references:

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references should be listed separately (e.g., after the reference list) under the heading "Web references".

Personal communications, manuscripts in preparation and other unpublished data should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text in parentheses.

### Figures

All colour illustrations will be published free of charge.

All figures must be uploaded as separate files. Figure legends should be listed **on a separate page** in numerical order and should contain brief but comprehensible explanations.

Figures should be referred to in the text in numerical sequence as follows: Fig. 1, Figs 2–4. The place at which a figure is to be inserted in the printed text should be indicated clearly on a manuscript. Where a figure has more than one panel, each panel should be labeled in the top left-hand corner using lower case letters in parentheses i.e. '(a)', '(b)' etc., and a brief description of each panel given in the figure legend.

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce previously published figures or tables. When an individual is identifiable in a photograph written consent must be obtained. This permission must include the right to publish in electronic media.

Print publication requires high quality, EPS (lineart) or TIFF/PDF (halftone/photographs) files are preferable (though GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission). MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones: >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Detailed instructions for electronic artwork preparation may be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

### Tables

Tables should be referred to in the text in numerical sequence as follows: Table 1, Table 2. Each table, with an appropriate brief legend, comprehensible without reference to the text, should be typed on a separate page. For footnotes, use superscripts 'a', 'b', 'c', etc., not asterisks or other symbols.

### Supporting Information

*EJP* encourages the submission of underlying data sets, appendices, additional figures or tables, movie files, animations, etc. as online supporting information. Supporting information should be uploaded during manuscript submission (see Section 3). Supporting information should be important ancillary information that is relevant to the parent article but which is not included in the typeset PDF but can be accessed via a link from this PDF.

To submit any material to be published as supporting material please choose the item "supporting information when uploading the files of tables or figures.

Please use the following terms:

- for tables: "tableS1", "tableS2" etc.
- for figures: "figureS1", "figureS2" etc. The figure legends should be included in the figure's file.
- for parts of the manuscript's text: "methodsS1", "resultsS1", "discussionS1" or "AppendixS1" (please note that it is not possible to publish additional material for the introduction)
- please indicate and cite clearly in your manuscript the supporting information using the terms given above.

### Units & Abbreviations

Measurements of length, height and volume should be reported in metric units (metre, kilogram, litre). Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressures in millimetres of mercury or

kPa with the alternative units in parentheses. All other measurements including laboratory measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI).

Abbreviations should be limited and defined after the first use of the term.

### **Drug Names**

Generic names of drugs should be used where possible. When quoting from specific materials on proprietary drugs, authors must state in parentheses the name and address of the manufacturer.