



# **DESENVOLVIMENTO COGNITIVO E SINTOMAS SENSORIAIS EM UM MODELO ANIMAL DE DEFICIÊNCIA DE FERRO PARA A SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS.**

**Palavras-Chave:** Deficiência de ferro, Síndrome das pernas inquietas, Limiar de dor

**Giovanna Antonella Martineli Rodrigues [UNICAMP]**

**Beatriz da Silva Franco [UNICAMP]**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea Maculano Esteves (orientadora) [UNICAMP]**

---

## **INTRODUÇÃO**

A Síndrome das Pernas Inquietas (SPI) é uma condição que acomete cerca de 5% da população brasileira (GBE-SPI, 2007). Consiste em uma sensação desconfortável ou necessidade intensa de mover os membros do corpo, principalmente os inferiores, embora também possa se estender aos membros superiores, em alguns casos raros (Aldrich et al., 1995; Ferri et al., 2015). Os sintomas da SPI geralmente iniciam, ou aumentam, no final do dia e à noite, quando o indivíduo está repousando (Montplaisir et al., 2010). Além de causar insônia, geralmente a SPI está relacionada com o Movimento Periódico das Pernas (MPP), um distúrbio do sono que causa despertares durante o repouso, o que compromete a qualidade do sono (Montplaisir et al., 1997).

Os fatores de risco mais comuns para o desenvolvimento da SPI são a deficiência de ferro (GBE-SPI, 2007; Earley et al., 2014), e a disfunção dopaminérgica (Connor et al., 2009; García-Borreguero et al., 2012). Diversos estudos relatam a presença de deficiência de ferro em pacientes com SPI (Varandas, 2013; Allen et al., 2013), ao mesmo tempo que o tratamento com suplementação de ferro traz melhorias aos sintomas (O'keeffe, 1994; Allen et al., 2018). O ferro é um nutriente muito importante para o funcionamento normal de processos metabólicos, como a síntese de DNA (Andrews, 1999). Sua deficiência pode ocasionar problemas na cognição, além de existirem estudos que mostram sua relação com o aumento da resposta à dor (Dowling et al., 2009; Dowling et al., 2011).

Estudos neuropsicológicos apontam que pacientes com essa síndrome costumam apresentar diminuição das funções cognitivas, como dificuldade na fala e na marcha, além de redução na atenção a curto prazo (Kim et al., 2014; Faria et al., 2014). É possível relacionar a diminuição da cognição com um dos principais sintomas da SPI, que é a perda de sono. Isso porque seus pacientes possuem maior dificuldade nas atividades comandadas pela parte frontal do córtex cerebral, região fortemente ligada à qualidade do sono (Pearson et al., 2006). Além disso, na SPI ocorre disfunção da dopamina, que causa sintomas semelhantes a transtornos de atenção, como déficit de atenção e hiperatividade (Kim et al., 2014; Estevinho & Soares-Fortunato, 2003).

Existe uma estreita relação entre doenças do sono e dor crônica. Um sono de baixa qualidade é capaz de diminuir o limiar de dor, além de reduzir a tolerância do paciente a esse tipo de estímulo (Goulart et al., 2014). A percepção da dor ocorre no córtex cerebral, sendo que um neurônio nociceptor periférico conduz o estímulo doloroso do Sistema Nervoso Periférico (SNP) até o tálamo, no Sistema Nervoso Central (SNC) (Varandas, 2013).

Sendo assim, o presente estudo avaliou alterações cognitivas e limiar doloroso de um modelo animal para SPI (modelo animal com deficiência de ferro).

## **METODOLOGIA**

Ao completarem 35 dias de vida, todos os animais (CEUA 5255-1/2019) passaram a receber a dieta AIN93M, sendo que o grupo controle (CTRL) recebeu uma concentração de ferro padrão (40mg/kg) e o grupo deficiência de ferro (DFe) recebeu uma concentração de ferro restrita (<4mg/kg). Após 5 semanas completas de dieta específica, todos os animais passaram pelo teste de reconhecimento de objetos e o teste de limiar de dor. Ambos os testes foram feitos de 15 em 15 dias, a fim de investigar o progresso dos sintomas, até os animais completarem 10 semanas de dieta (CTRL ou DFe). Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico seguido de decapitação (CFMV, 2012) e as amostras de tecidos foram coletadas para futuras análises.

### *Teste de reconhecimento de objetos (TRO)*

Além de uma habituação prévia, o TRO possui duas etapas, uma seguida da outra, com um intervalo de um minuto. Na primeira etapa do experimento (T1), o animal é colocado em uma caixa com dois objetos idênticos (A e B), com duração máxima de 20 segundos de exploração. Na segunda etapa (T2), muda-se um dos objetos, colocando um diferente no lugar (o objeto B), com duração máxima de 20 segundos de exploração. É considerado exploração quando o animal está bem próximo ao objeto e/ou o cheiro/toca. Os objetos utilizados na coleta da 6<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana foram diferentes. O intuito é observar a capacidade de o animal reconhecer os objetos, já que se ele se lembrar do objeto familiar, gastará mais tempo explorando o novo objeto (teste adaptado de Ennaceur & Delacour, 1988). Sendo assim, durante o teste é analisado o tempo em que o animal gasta em cada objeto (A e B) e o tempo total em que o animal leva para atingir 20 segundos de exploração. Os testes foram realizados a partir das 18h (ciclo escuro).

### *Teste de limiar de dor (LDor)*

Para a análise de limiar de dor, foi realizado o teste do reflexo de flexão-retirada nociceptiva da pata (Randall & Selitto, 1957). O teste foi realizado por um único experimentador, utilizando o randall-selitto, que aplica uma força mecânica linearmente crescente ao dorso da pata traseira de rato. Os limiares de retirada relatados são a média de três testes realizados, com intervalos de 5 minutos. Os testes foram realizados entre 13h-15h (ciclo claro).

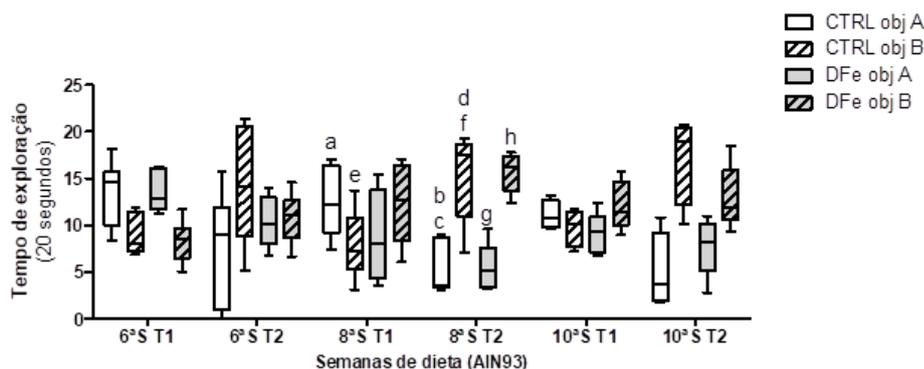
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O teste de reconhecimento de objetos foi analisado pelo modelo misto linear. Para a análise foram considerados os momentos T1 e T2 coletados na 6<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana de dieta (denominado 'tempo' na análise de dados).

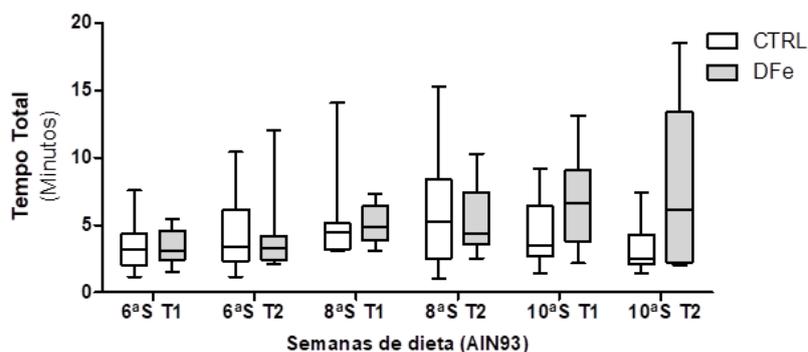
Na análise da variável de Tempo de exploração, primeiramente foi realizada a análise de interação entre grupo e tempo, e diferenças estatísticas foram encontradas (Figura 3,  $F_{(11, 216)} = 7.08$ ,  $p < 0.000$ ), onde na 8<sup>a</sup> semana o grupo CTRL reduziu a exploração no objeto A no T2 em relação ao T1 (post hoc bonferroni,  $p = 0.001$ ), conseqüentemente aumentou a exploração do objeto B no T2 em relação ao B no T1 (post hoc bonferroni,  $p = 0.000$ ) e aumentou a exploração do objeto B em relação ao objeto A no T2 (post hoc bonferroni,  $p = 0.000$ ). Já o grupo DFe, também na 8<sup>a</sup> semana, mostrou aumento de exploração no objeto B em relação ao objeto A no T2 (post hoc bonferroni,  $p = 0.004$ ). Na análise separada de grupo, não foram encontradas diferenças estatísticas.

Para a variável Tempo Total foi realizada uma transformação logarítmica a fim de normalizar os dados. Não foram encontradas diferenças estatísticas na análise de interação entre grupo e tempo. Ao analisar separadamente o tempo e o grupo, o grupo mostrou uma tendência estatística (Figura 3,  $F_{(2, 216)} = 4.10$ ,  $p = 0.059$ ,

modelo misto linear), onde o grupo DFe mostrou uma média de tempo total maior em relação ao grupo CTRL (post hoc bonferroni,  $p=0.059$ ).

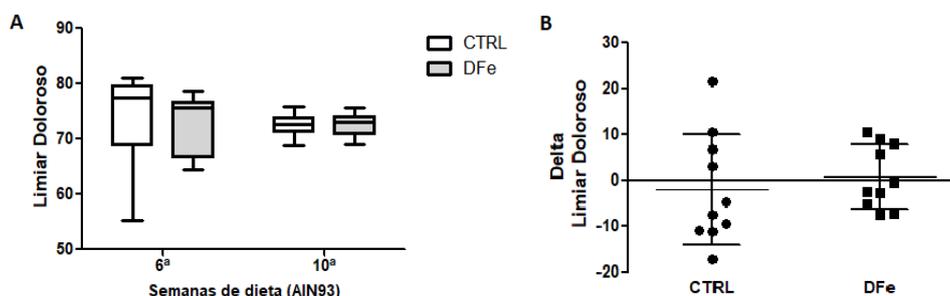


**Figura 2.** Tempo de exploração em cada objeto durante o Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO), realizado na 6ª, 8ª e 10ª semana de dieta. Cada teste possui duas etapas de contagem de tempo de exploração (T1 e T2), onde no T1 os objetos A e B são idênticos e no T2 o objeto B é diferente. Dados apresentados em médias e desvios-padrão, ( $n = 9-11$ ). Os dados foram analisados pelo Modelo Misto, com post hoc Bonferroni (a difere de b; c difere de d; e difere de f; g difere de h) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Tempo total de duração do Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO), realizado na 6ª, 8ª e 10ª semana de dieta. Cada teste possui duas etapas de contagem de tempo de exploração (T1 e T2). Dados apresentados em médias e desvios-padrão, ( $n = 9-11$ ). Os dados foram analisados pelo Modelo Misto, com post hoc Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

Durante o experimento foi realizado o Teste de Limiar de Dor, na 6ª e na 10ª semana de dieta. Os dados foram analisados com valores absolutos através da análise de medidas repetidas, e nenhuma diferença estatística foi encontrada. Ao analisar o delta dos valores através do teste T, os grupos não mostraram diferença estatística.



**Figura 4.** Teste de Limiar de Dor. (A) Valores absolutos do teste de limiar doloroso durante a 6ª e a 10ª semana de dieta; (B) Delta do limiar doloroso (valor 10ª semana – valor 6ª semana). Dados apresentados em médias e desvios-padrão, ( $n = 9-11$ ). Os dados foram analisados por ANOVA de Medidas Repetidas (A) e Test T (B) ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES:

O modelo animal utilizado no presente estudo é relatado na literatura e considerado o ideal para analisar alterações da SPI (Salminen et al., 2021).

De acordo com os resultados obtidos, a restrição de ferro provocou maior tempo de exposição aos testes, o que pode indicar lentidão na obtenção de informações contextuais, reduzindo a capacidade de detectar novidades (Piterkin et al., 2008). Além disso, é possível observar que os animais DFe não tiveram diferença entre o tempo gasto no objeto A e o B no T2 no teste da 6ª semana, indicando que os animais DFe não tiveram uma memória consolidada para perceber a novidade, já que o teste de REC é fornece um índice de memória de reconhecimento baseado no tempo gasto para explorar o novo objeto fornecido (Leger et al., 2013). No entanto, ao decorrer das semanas os animais de ambos os grupos tiveram índices parecidos, podendo indicar uma adaptação e conseqüentemente a necessidade de mudança do protocolo.

Um fator que pode ter auxiliado nesse resultado é o horário em que os testes foram feitos, das 18h-20h. Qu et al., 2007 demonstraram em seu estudo alteração na atividade locomotora das 9-11h, que foi considerado como o momento em que os sintomas da SPI são mais intensos, pois corresponderia ao início da noite em humanos. No entanto, no presente estudo, como a proposta era analisar o comportamento cognitivo, especulou-se avaliar essa variável no período de maior atenção do animal, que é apresentado no período escuro.

Além disso, Apesar dos animais terem tido a deficiência periférica comprovada, é necessário avaliar se essa alteração de ferro ocorreu no cérebro, que é uma das causas estudadas para o desenvolvimento da SPI (Earley et al., 2011).

Observa-se que o gênero dos animais influencia na intensidade dos sintomas, sendo que nas fêmeas eles tendem a ser mais fortes (Ohayon et al., 2012), o que demonstra que pode existir uma variação da sintomatologia entre os sexos. Sendo assim, se torna importante avaliar as fêmeas para identificar possíveis diferenças entre os sexos.

Sendo assim, pode ser que este modelo se adapte às alterações cognitivas e não tenha mudanças relacionadas à dor, visto que esse é o primeiro estudo a analisar o comportamento cognitivo através do teste de reconhecimento de objetos, e o limiar doloroso neste modelo animal de SPI.

Neste contexto, considerando que foram utilizados somente ratos machos, bem como o horário que os testes foram realizados, os resultados sugerem que os animais com deficiência de ferro apresentaram alterações cognitivas iniciais, no entanto, as mesmas não persistiram nas repetições do teste. Além disso, não foram encontradas alterações no limiar de dor relacionadas aos sintomas e conseqüências da SPI no modelo animal de deficiência de ferro.

## BIBLIOGRAFIA

- ALDRICH MS, Allen R, Allen R, Buchholz D, Buchholz D, Coccagna G, Earley C, Earley CJ, Feest TG, Hening W, Kavey N, Lavigne G, Lipinski J, Lugaresi E, Montagna P, Montplaisir J, Mosko SS, Oertel W, Walters AS. **Toward a better definition of the Restless Legs Syndrome, Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society.** Vol. 10, no. 5, 634-642. 1995.
- ALLEN RP, Auerbach S, Bahrain H, Auerbach M, Earley CJ. **The prevalence and impact of restless legs syndrome on patients with iron deficiency anemia.** Am J Hematol 88:261-4, 2013.
- ALLEN RP, Picchiatti DL, Auerbach M, Cho YW, Connor JR, Earley CJ, Garica-Borreguera D, Kotagal S, Manconi M, Ondo W, Ulfberg J, Winkelman J. International Restless Legs Syndrome Study Group (IRLSSG). **Evidence-based and consensus clinical practice guidelines for the iron treatment of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease in adults and children: an IRLSSG task force report.** Sleep Med 41:27-44, 2018.
- ANDREWS, NC. (1999). **Disorders of iron metabolism.** N Engl J Med, 341(26), 1986-1995. doi:10.1056/NEJM199912233412607
- CONNOR JR, Wang XS, Allen RP, Beard JL, Wiesinger JA, Felt BT, Earley CJ. **Altered dopaminergic profile in the putamen and substantia nigra in restless leg syndrome.** Brain : a journal of neurology. 132(Pt 9):2403-12, 2009.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). **Resolução no 1000**, Brasil. Brasília, 11 de maio de 2012. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br>
- DOWLING P, Klinker F, Stadelmann C, Hasan K, Paulus W, Liebetanz D. **Dopamine D3 receptor specifically modulates motor and sensory symptoms in iron-deficient mice.** Journal of Neuroscience, 31(1), 70-77. 2011.

- DOWLING P, Klinker F, Amaya F, Paulus W, Liebetanz D. **Iron deficiency sensitizes mice to acute pain stimuli and formalin-induced nociception.** *J Nutr* 139:2087–2092. 2009.
- EARLEY CJ, Connor JR, García-Borreguero D, Jenner P, Winkelman J, Zee PC, Allen R. **Altered brain iron homeostasis and dopaminergic function in restless legs syndrome (Willis-Ekbom disease).** *Sleep Med* 15:1288–301, 2014.
- EARLEY, C. J. et al. **The dopamine transporter is decreased in the striatum of subjects with restless legs syndrome.** *Sleep*, v. 34, n. 3, p. 341-7, Mar 1. 2011.
- ENNACEUR, A. & Delacour, J. **A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats.** 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59. 1988.
- ESTEVINHO MF, Soares-Fortunato JM. **Dopamina e receptores.** *Revista Portuguesa de Psicossomática*, v. 5, n. 1, p. 21-31, 2003.
- FARIA RP, Foss MP, Eckeli AL, Speciali JG. **Neuropsicologia da Síndrome das Pernas Inquietas: Revisão de Literatura.** *Revista Neurociências*, v. 22, n. 1, p. 127-133, 2014.
- FERRI R, Rundo F, Zucconi M, Manconi M, Bruni O, Ferini-Strambi L, Fulda S. **An evidence-based analysis of the association between periodic leg movements during sleep and arousals in restless legs syndrome.** *Sleep* 38:919– 24, 2015.
- GARCÍA-BORREGUERO D, Högl B, Ferini-Strambi L, Winkelman J, Hill-Zabala C, Asharian A, Allen R. **Systematic evaluation of augmentation during treatment with ropinirole in restless legs syndrome (Willis-Ekbom disease): results from a prospective, multicenter study over 66 weeks.** *Mov Disord.* 27:277-83, 2012.
- GBE-SPI, Grupo Brasileiro de Estudos em Síndrome das Pernas Inquietas. **Síndrome das Pernas Inquietas: Diagnóstico e Tratamento, Opinião de Especialistas Brasileiros.** Arquivo Neuropsiquiátrico. 2007.
- GOULART LI, Rodrigues RND, Peres MFP. **Restless legs syndrome and pain disorders: what's in common?** *Current pain and headache reports*, 18(11), 461. 2014.
- KIM SM, Choi JW, Lee C, Lee BU, Koo YS, Kim KH, Jung KY. **Working memory deficit in patients with restless legs syndrome: an event-related potential study.** *Sleep medicine*, 15(7), 808-815. 2014.
- Leger M., Quiedeville A., Bouet V. Haelewyn B, Boulouard M, Sgumann-Bard P, Freret T. **Object recognition test in mice.** *Nat Protoc* 8, 2531–2537; 2013.
- MONTPLAISIR J, Allen RP, Arthur W, Ferini-Strambi L. **Restless Legs Syndrome and Periodic Limb Movements during Sleep.** in **Principles and Practice of Sleep Medicine:** Fifth Edition. Elsevier Inc. 1026-1037. 2010.
- MONTPLAISIR J, Boucher S, Poirier G, Lavigne G, Lapierre O, Lesperance P. **Clinical, polysomnographic, and genetic characteristics of restless legs syndrome: a study of 133 patients diagnosed with new standard criteria.** *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society.* 12(1):61-5. 1997.
- OHAYON, Maurice M.; O'HARA, Ruth; VITIELLO, Michael V. **Epidemiology of restless legs syndrome: a synthesis of the literature.** *Sleep medicine reviews*, v. 16, n. 4, p. 283-295, 2012.
- O'KEEFFE, S. T.; Gavin, k.; Lavan, J. N. **Iron status and restless legs syndrome in the elderly.** *Age and ageing*, v. 23, n. 3, p. 200-203, 1994.
- PEARSON VE, Allen RP, Dean T, Gamaldo CE, Lesage SR, Earley CJ. **Cognitive deficits associated with restless legs syndrome (RLS).** *Sleep medicine*, 7(1), 25-30. 2006.
- Piterkin P, Cole E, Cossette MP, Gaskin S, Mumby DG. **A limited role for the hippocampus in the modulation of novel-object preference by contextual cues.** *Learn Mem.* 15:785–791; 2008.
- QU, Shen et al. **Locomotion is increased in a11-lesioned mice with iron deprivation: a possible animal model for restless legs syndrome.** *Journal of neuropathology and experimental neurology*, v. 66, n. 5, p. 383-388, 2007.
- RANDALL LO, Selitto JJ. **A method of measurement of analgesic activity on inflamed tissue.** *Arch Int Pharmacodyn.* 111:409–19. 1957.
- SALMINEN, Aaro V. et al. **Consensus Guidelines on Rodent Models of Restless Legs Syndrome.** *Movement Disorders*, v. 36, n. 3, p. 558-569, 2021.
- VARANDAS CMB. **Fisiopatologia da dor** (Doctoral dissertation, [sn]). 2013.