Fabio Martinez dos Santos

**Mobilização Neural: Avaliação molecular e comportamental em ratos *Wistar*
após indução de dor neuropática**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

Fabio Martinez dos Santos

**Mobilização Neural: Avaliação molecular e comportamental em ratos *Wistar*
após indução de dor neuropática**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Profa^o Dra. Marucia Chacur

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Santos, Fabio Martinez dos.

Mobilização neural: avaliação molecular e comportamental em ratos *Wistar* após indução de dor neuropática / Fabio Martinez dos Santos. – São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Marucia Chacur.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Dor neuropática.

Versão do título para o inglês: Neural mobilization: molecular and behavioral assessment in rats after induction of neuropathic pain.

1. PAG 2. DRG 3. Fisioterapia 4. Opióides 5. Substância P 6. TRPV 1 I. Chacur, Profa. Dra. Marucia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB065/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fabio Martinez dos Santos.

Título da Tese: Mobilização neural: avaliação molecular e comportamental em ratos *Wistar* após indução de dor neuropática.

Orientador(a): Profa. Dra. Marucia Chacur.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **091** nas fls. **131** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Marucia Chacur**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa " *Mobilização Neural: Avaliação molecular e comportamental em ratos Wistar após indução de dor neuropática*" do qual participam o(s) aluno(s) **Fabio Martinez dos Santos, Regina Paula Bonifacio**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **25.07.2012**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 25 de julho de 2012.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho a minha filha Lara, aos meus pais e em especial, a minha esposa Paula pelo incentivo constante a minha formação profissional.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter concedido saúde e força para realização deste sonho!

A minha família, por compreender a minha ausência durante todo o tempo que dediquei à execução desta tese.

A Maru, a qual deixou a muito tempo de ser minha orientadora e se tornou uma irmã. A você, agradeço por TUDO! Por abrir as portas do seu laboratório, por me conceder uma linha de pesquisa, por me ensinar a perder o medo da pesquisa, inclusive de escrever, por todos os incentivos, por ter feito que eu me tornasse uma pessoa melhor ao longo desses anos e por toda a lealdade desde sempre! Eternamente grato e fiel a você!

Ao amigo Marcelo Berti, o qual apresentou o Departamento de Anatomia no ano de 2005 a mim. Obrigado pela força meu amigo! Valeu pela tentativa!!

Ao meu amigo Samuel, por ter apresentado o Departamento de Fisiologia no ano de 2006, para que eu tentasse ingressar no mestrado. Obrigado meu irmão!

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por ter oferecido os recursos necessários para realização do sonho de ser Doutor em Anatomia. A Comissão de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais por terem acreditado no projeto inicial. Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório e de vida, Joyce, Bianca, Aline, Milena, Daniel, Igor, Rafael, e Mara, componentes fundamentais para a harmonia do laboratório de Neurodor. Vocês são incríveis! Obrigado por tudo!

RESUMO

Santos FM. Mobilização Neural: Avaliação molecular e comportamental em ratos *Wistar* após indução de dor neuropática. [tese (doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A técnica de Mobilização Neural (MOB) é um método não invasivo que demonstrou tanto na pesquisa básica, como na pesquisa clínica ser eficaz na redução da sensibilidade à dor. O presente, estudo visa examinar os efeitos da MOB na disfunção locomotora, na força muscular, nas alterações morfológicas no nervo isquiático e nas alterações moleculares induzida pela constrição crônica (CCI) do nervo isquiático de ratos *Wistar*. Para analisar a disfunção locomotora utilizamos o índice funcional do nervo Isquiático (IFC). Para analisar a força muscular, o sistema Biopac System. A ultraestrutura do nervo foi analisada pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão e as alterações moleculares por meio de ensaios de *Western blot*. Ao finalizarmos os tratamentos com MOB os animais foram eutanasiados e os tecidos como, nervo isquiático, gânglios das raízes posteriores (DRG L4-L6) e Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) foram retirados. Os DRG's foram processados pela técnica de *Western Blot* para a detecção da substância P (SP), receptor de potencial transitório vanilóide tipo I (TRPV1) e receptores opióides dos tipos μ (MOR), δ (DOR) e κ (KOR). Com relação a PAG, analisamos somente os receptores opióides por *Western Blot*. Nossos resultados demonstraram uma reversão da disfunção locomotora induzida pela CCI após a MOB e aumentou 172% a força do músculo tibial anterior nos animais tratados quando comparado com os animais do grupo CCI. Nossos estudos sobre a ultraestrutura do nervo isquiático demonstraram intenso processo de degeneração Waleriana após a CCI e regeneração após a MOB. Podemos sugerir um papel importante da MOB na modulação da expressão da SP e do TRPV 1. Sobre os receptores DOR e KOR no DRG, não encontramos alterações estatísticas entre os grupos, mas observamos um aumento da expressão de MOR após a MOB. Na PAG, nós observamos uma diminuição de DOR e KOR no grupo CCI e aumento após a MOB. Por outro lado, não encontramos alterações estatísticas para o receptor MOR. Baseado nestes achados, podemos sugerir que a MOB reverte a disfunção locomotora, aumenta a força muscular, induz a regeneração do nervo isquiático, modula a SP e TRPV 1 e aumentou a expressão de MOR no DRG's. Sugerimos ainda que, a analgesia induzida pela técnica de MOB possa ter um envolvimento também com o sistema inibitório descendente de dor resultando na inibição da transmissão do estímulo nociceptivo aferente e assim, diminuindo a dor neuropática devido influência da MOB sobre os opióides na PAG.

Palavras-chave: PAG. DRG. Fisioterapia. Substância P. Opióides. TRPV1.

ABSTRACT

FM Santos. Neural mobilization: molecular and behavioral assessment in rats after induction of neuropathic pain. [Ph. D. (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Neural mobilization technique (MOB) is a noninvasive method that demonstrated to be effective in reducing pain sensitivity in both clinical and research study. The present study aims to examine the effects of MOB in locomotors dysfunction, muscle strength, morphological changes in sciatic nerve and molecular changes induced by chronic constriction (CCI) of the sciatic nerve in Wistar rats. To analyze locomotors dysfunction we used the Sciatic nerve functional index (SFI). To analyze muscle strength, was used Biopac System. The nerve morphology was analyzed using electron microscopy and molecular changes through western blot assays. After MOB treatments, animals were euthanized and tissues such as, sciatic nerve, the posterior root ganglions (DRG L4-L6) and substance periaqueductal gray (PAG) were removed. The DRG were processed by western blot for detection of substance P (SP), transient receptor potential vanilloid type I (TRPV1) and opioids receptors (MOR, DOR, KOR). Regarding PAG, we analyze only opioids receptors. Our results demonstrated a full reversal of locomotors dysfunction-induced by CCI after MOB treatment and an increase of 172% on maximal tetanic muscle strength in animals treated with MOB when compared to the CCI group. Our studies on photomicrography of sciatic nerve showed an intense Wallerian degeneration process in CCI animals and an intense regeneration of myelinated fibers. In western blot assays, we identified, in DRG, an increase of SP and TRPV1 expression after CCI and a decrease of optical density after MOB treatment. Regarding opioid receptor, we did not identify statistical changes on DOR and KOR in DRG, but we observed an increased expression of MOR in CCI after MOB treatment group. In PAG analyses, we observed a decrease in DOR and KOR expression after MOB treatment when compare with CCI animals. On the other hand, we did not identify any changes on MOR receptor. Based on our findings, we suggest that treatment with neural mobilization technique it is able to reverses the locomotors dysfunction and increases maximum tetanic force of the tibialis anterior muscle after CCI. Furthermore, the same treatment was also able to induce a severe regeneration in the sciatic nerve after treatment. Still, we can suggest an important role of MOB in modulating SP and TRPV 1 expression. We suggest that antinociceptive effect induced by MOB technique can also be involved with descending pain inhibitory system resulting in inhibition of the transmission of afferent nociceptive stimulus and thereby reducing neuropathic pain because of the influence of MOB opioids in the PAG.

Keywords: PAG. DRG. Physiotherapy. Substance P. Opioids. TRPV1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ilustração do teste de Mobilização Neural elevação da perna estendida.....	21
Figura 2 -	Ilustração do modelo de injúria por constrição crônica (CCI).....	25
Figura 3 -	Representação esquemática dos animais utilizados para técnica <i>Western Blot</i>	26
Figura 4 -	Representação esquemática dos animais utilizados Microscopia Eletrônica.....	27
Figura 5 -	Representação esquemática dos animais utilizados para os ensaios do índice funcional do nervo isquiático e força muscular.....	27
Figura 6 -	Ilustração do tratamento com a técnica de Mobilização Neural.....	28
Figura 7 -	Ilustração índice funcional do nervo isquiático - Vista geral da passarela.....	30
Figura 8 -	Ilustração do esquema da impressão em papel da pata de um rato normal (A) e com lesão do nervo isquiático (B).....	30
Figura 9 -	Ilustração da análise da função contrátil (BIOPAC Systems, CA, EUA).....	31
Figura 10 -	Índice funcional do nervo isquiático.....	34
Figura 11 -	Análise da força muscular tetânica máxima do músculo tibial anterior.....	35
Figura 12 -	Microscopia Eletrônica de Transmissão do nervo isquiático.....	36
Figura 13 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão da Substância P no Gânglio da raiz posterior de ratos.....	37
Figura 14 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão do TRPV1 no gânglio da raiz posterior de ratos.....	38
Figura 15 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de MOR no gânglio da raiz posterior de ratos.....	39
Figura 16 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de DOR no gânglio da raiz posterior de ratos.....	40
Figura 17 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de KOR no gânglio da raiz posterior de ratos.....	40

Figura 18 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de MOR na substância cinzenta periaquedutal.....	41
Figura 19 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de DOR na substância cinzenta periaquedutal de ratos.....	42
Figura 20 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de KOR na substância cinzenta periaquedutal de ratos.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

14d	DÉCIMO QUARTO DIA
CCI	CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO ISQUIÁTICO
CCI MOB	CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO ISQUIÁTICO COM MOBILIZAÇÃO
CGRP	PEPTÍDEO RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA
DOR	RECEPTOR OPIÓIDE δ
DRG	GÂNGLIO DA RAIZ POSTERIOR
FDL	FUNÍCULO DORSO LATERAL
FOP	FALSO OPERADO
FOP MOB	FALSO OPERADO COM MOBILIZAÇÃO NEURAL
IEC	ÍNDICE ESTÁTICO DO ISQUIÁTICO
IFC	ÍNDICE FUNCIONAL DO NERVO ISQUIÁTICO
KOR	RECEPTOR OPIÓIDE k
L3	TERCEIRA VÉRTEBRA LOMBAR
L4	QUARTA VÉRTEBRA LOMBAR
L5	QUINTA VÉRTEBRA LOMBAR
L6	SEXTA VÉRTEBRA LOMBAR
LTP	POTENCIAL DE LONGA DURAÇÃO
MI	MEDIDA INICIAL
MOB	MOBILIZAÇÃO NEURAL
MOR	RECEPTOR OPIÓIDE μ
NGF	FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL
PAG	SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

RVM	MEDULA ROTRAL VENTROMEDIAL
SLR	STRAIGHT LEG RAISE - ELECAÇÃO DA PERNA ESTENDIDA
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
SNP	SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO
SP	SUBSTÂNCIA P
TRPV1	RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE TIPO I

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1 DOR NEUROPÁTICA	14
1.2 POTENCIAIS DE LONGA DURAÇÃO (LTP) NA DOR.....	15
1.3 A PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE TIPO 1 E DA SUBSTÂNCIA P NA DOR.....	17
1.4 A INFLUÊNCIA DO SISTEMA OPIÓIDE ENDÓGENO NO CONTROLE DA DOR.....	18
1.5 TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA POR MOBILIZAÇÃO NEURAL.....	19
1.6 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 ANIMAIS	24
3.2 INDUÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA.....	25
3.3 PLANEJAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	26
3.4 PROCEDIMENTO TERAPÊUTICO – TÉCNICA DE MOBILIZAÇÃO NEURAL.....	27
3.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LOCOMOTORA PELO ÍNDICE FUNCIONAL DO NERVO ISQUIÁTICO (IFC)	28
3.6 ANÁLISE DA FUNÇÃO CONTRÁTIL (FORÇA TETÂNICA MÁXIMA DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR)	30
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO NERVO ISQUIÁTICO.....	31
3.8 ENSAIOS DE <i>WESTERN BLOT</i>	32
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4 RESULTADOS.....	33
4.1 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LOCOMOTORA	33
4.2 ANÁLISE DA FUNÇÃO CONTRÁTIL	34
4.3 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA DO NERVO ISQUIÁTICO	35
4.4 EFEITOS DA MOBILIZAÇÃO NEURAL NOS PARÂMETROS MOLECULARES	36
4.4.1 <i>SP no DRG - segmento L4- L6</i>	36
4.4.2 <i>TRVP 1 no DRG - segmento L4- L6</i>	37
4.4.3 <i>MOR no DRG - segmento L4- L6</i>	38
4.4.4 <i>DOR no DRG - segmento L4- L6</i>	39
4.4.5 <i>KOR no DRG - segmento L4- L6</i>	40
4.4.6 <i>MOR na PAG</i>	41
4.4.7 <i>DOR na PAG</i>	41
4.4.8 <i>KOR na PAG</i>	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Dor neuropática

A lesão do nervo espinal em humanos resulta, muitas vezes, em dor persistente ou crônica, caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia (dor em resposta a estímulos não lesivos) e hiperalgesia (dor exagerada em resposta a estímulos lesivos) (Payne, Norfleet, 1986). A ocorrência de lesões no sistema nervoso periférico (SNP) e na medula espinal contribui para o desenvolvimento da dor neuropática. Estas incluem a presença de focos ectópicos de lesão nas fibras nervosas periféricas, as quais mantêm contínuos os impulsos nervosos aferentes para o sistema nervoso central (SNC). Estes fatos, associados à sensibilização central (decorrente do aumento da excitabilidade neural do neurônio de 2º ordem em resposta aos altos níveis de excitação do neurônio de 1º ordem), na vigência de lesão de nervos periféricos, contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática (Devor, Seltzer, 1999; Schaible, 2007). Na prática clínica, tem sido extensivamente reportado que a dor neuropática é de difícil tratamento, devido ao inadequado entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manutenção deste tipo de dor (Aley, Levine, 2002; Sah, Ossipo, Porreca, 2003). Considerando toda circuitaria envolvida na indução ou controle da dor neuropática, modelos experimentais em animais facilitam o entendimento da fisiopatologia e controle da dor neuropática.

Na literatura encontramos diferentes modelos animais para a indução deste tipo de dor, os quais têm sido desenvolvidos para testar e comparar diversos tipos de fármacos e para auxiliar num melhor entendimento do mecanismo de ação. Considerando que esses modelos induzem alterações comportamentais nos roedores, como hipernocicepção, alodinia e dor espontânea, similares aos sintomas observados durante a dor neuropática em humanos, estudos que utilizam estas ferramentas e descrevem os diversos processos fisiopatológicos periféricos e centrais, que ocorrem após a lesão de nervo, podem ser a base que permite delinear os mecanismos da dor neuropática (Backonja, 2003). Estes modelos podem ser divididos em: 1) modelos de neuropatia periférica induzida por doença, nos quais se incluem a dor neuropática acarretada por diabetes Mellitus e o modelo de neuralgia pós-herpética; 2) modelos de dor central, os quais consistem em lesão da medula espinal, que pode ser por contusão, lesão fotoquímica ou agentes citotóxicos; 3) modelos de lesão de nervos espinais, tais como neuroma, lesão por constrição crônica (*chronic constriction injury* – CCI), ligação parcial do nervo isquiático, ligação de nervos espinais, crioneurólise do

isquiático, ressecção do ramo caudal inferior e neurite inflamatória do isquiático (Wang, Wang, 2003). A transecção total ou ligação do nervo isquiático reproduzem as condições clínicas de amputação, enquanto que a CCI do isquiático, por possuir ligaduras ao redor do nervo, simula as condições clínicas de compressão nervosa crônica, como a irritação da medula espinal induzida por hérnia de disco lombar (Zimmermann, 2001). Esses sintomas iniciam-se do 1º ao 5º dia após a indução da lesão, e se estendem por, pelo menos, dois meses (Bennett, Xie, 1988). As alterações estruturais envolvem degeneração de todas as fibras A e a maioria das fibras C (Basbaum et al., 1991). Assim, acreditamos que o modelo de indução da dor neuropática que consiste em quatro amarraduras frouxas ao redor do nervo isquiático (Bennett, Xie, 1988) possui grande aproximação clínica como, por exemplo, nos casos síndrome do túnel do carpo ou compressão do nervo isquiático, sendo, portanto, utilizada em nosso projeto de pesquisa para caracterizar os sinais da neuropatia periférica.

1.2 Potenciais de Longa duração (LTP) na dor

Na literatura encontramos diversas teorias e propostas para o desencadeamento e tratamento da dor, inclusive a neuropática (devido à inflamação neurogênica). O estudo de revisão sobre LTP como alvo terapêutico na analgesia descrito por Ruscheweyh R et al., (2011), destaca as principais modalidades para indução da LTP como, por exemplo, a estimulação elétrica nervosa com frequência modulada que varia de baixa a alta, estimulação farmacológica e estimulação nociva natural, transecção ou ligadura do nervo isquiático (CCI) (Ruscheweyh et al., 2011) situações essas que sensibilizam as fibras nociceptivas do tipo C as quais fazem sinapses com os neurônios secundários existentes na lâmina I e II da coluna posterior da medula espinal. Na lâmina I, ocorre ativação dos receptores de neurocinina I (NK1) para substância P e canais de cálcio voltagem dependente. Esses eventos facilitam a formação da LTP espinal com consequente manutenção da informação nociceptiva (Ikeda et al., 2003). Neste sentido, a LTP espinal resulta no surgimento dos sinais clássicos de dor neuropática como aqueles decorrentes da lesão do nervo espinal, que resulta muitas vezes em dor crônica caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia e hiperalgesia (Payne, Norfleet, 1986).

Conhecida um evento complexo, o desencadeamento da LTP em fibras do tipo C, consiste em aumento da concentração intracelular de Ca^{+} no neurônio pós sináptico, seguido de inserção de novos receptores para glutamato (AMPA) na membrana celular, induzindo assim a sensibilização

da via nociceptiva. Os seguintes eventos ocorrem: abertura do receptor pós sináptico para glutamato (AMPA) seguido de influxo de sódio (Na^+) o qual gera a despolarização. Cabe ressaltar que, concomitantemente com a despolarização há a abertura do receptor de NMDA O qual é dependente de voltagem. Assim, com o influxo de sódio através do receptor AMPA, aumenta a concentração de cargas positivas fato que promove o desacoplamento de magnésio do receptor NMDA gerando uma sensibilização ainda maior do receptor AMPA além de induzir um influxo de Ca^+ também no neurônio pós sináptico. O aumento de cálcio intracelular ativa as proteínas quinases (cálcio-calmodulina quinase II (CaMKII) e quinase C, sendo que juntas, quando ativadas, induzem a um replicação de receptores AMPA para glutamato, que serão inseridos na membrana do neurônio pós sináptico (Bear, Connors, Paradiso, 2007; Sandkühler, 2011; Sandkühler, Gruber-Schoffnegger, 2012; Zhou et al., 2008). Neste sentido, essas alterações intracelulares e estruturais no neurônio pós sináptico (inserção de novos receptores AMPA) são responsáveis pela sensibilização das fibras C, induzindo aos potenciais de longa duração (Bear, Connors, Paradiso, 2007; Sandkühler, 2011; Sandkühler, Gruber-Schoffnegger, 2012).

Estudos recentes sugerem que a manutenção da LTP nas fibras do tipo C estão envolvidas com alterações na sinalização do neurônio pré sináptico, neurônio aferente primário, cujo corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes posteriores. Essas alterações envolvem a fosforilação do receptor glutamatérgico (Sandkühler, 2011; Sandkühler, Gruber-Schoffnegger, 2012), a liberação de substância P que age no receptor NK1 (Bie, Zhao, 2011), ativação receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1) (Zhou et al., 2008; Zhou, Zhou, Zhao, 2001) eventos estes que induzem a um aumento da condutância do sinal nociceptivo para a lâmina I da medula espinal.

Como já mencionado anteriormente, a dor induzida por inflamação periférica ou por dor neuropática, atualmente vem sendo associada ao envolvimento da LTP (Ruscheweyh et al., 2011). A importância da LTP na lâmina I da região posterior da medula espinal no desenvolvimento da hiperalgesia provocada por trauma foi primeiramente evidenciada por Ikeda et al., (2003), neste estudo os autores destacaram que os receptores para substância P (NK1) potencializavam a formação da LTP em situações de lesão do nervo espinal (Ikeda et al., 2003).

Atualmente, a prevenção da LTP vem sendo alvo de estudo como elemento chave para prevenção e alívio da dor, fato destacado no estudo de Ruscheweyh et al., (2011), em que os autores destacam a participação de antagonista de receptores opióides, moduladores de canais de cálcio

voltagem dependente, antidepressivos, antagonista do receptor NK1 e, antagonista de receptor para o glutamato (Ruscheweyh et al., 2011).

1.3 A participação do receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 e da substância P na dor

Após a lesão do nervo as principais alterações que contribuem para a indução de dor neuropática são encontradas na expressão do gene/proteína alterada em neurônios sensoriais primários. Após os danos às fibras sensoriais periféricas, ocorre um aumento da expressão dos receptores de TRPV1 nos neurônios mielinizados, contribuindo assim para o desenvolvimento da hiperalgesia (Ueda, 2006). O receptor de TRPV1 é um tipo de receptor constituído por seis domínios transmembrânicos, sendo encontrado na membrana celular e no retículo sarcoplasmático. Descrito como um receptor de capsaicina (ingrediente encontrado na pimenta) o TRPV 1 nos neurônios dos gânglios das raízes posteriores (DRG's) desempenham um papel essencial na geração do sinal de dor, sensibilizando assim o neurônio aferente primário que por sua vez despolariza os neurônios de segunda ordem das lâminas I e II da medula espinal favorecendo a formação de LTP (Nakanishi et al., 2010; Staaf et al., 2010). Neste sentido, o aumento da expressão de TRPV 1 está relacionado ao desenvolvimento de hiperalgesia térmica e alodinia, ambos envolvidos com a dor neuropática. Estudos apontam que o bloqueio dos receptores de TRPV 1 revertem o quadro de hiperalgesia e alodinia (Vilceanu et al., 2010).

Sabe-se que este receptor responde também a outros estímulos como, por exemplo, agentes pró inflamatórios endógenos como, o fator de crescimento neural (NGF), ATP, bradicinina, histamina, prostaaglandina, fosfolipases, proteases, além de alterações de pH provocados por lesões (pH 5,2) bem como, alteração da temperatura corporal ($> 43^{\circ}\text{C}$) (Chuang et al., 2001; Zhang et al., 2005). O receptor de TRPV1 possui ampla distribuição topográfica em estruturas que compõe o sistema nervoso como, PAG (Szallasi, Blumberg, 1999), medula espinal, tanto em corpos de neurônios da lâmina I e II quanto em células da glia da região lombossacral (Guo et al., 1999; Hwang, Valtschanoff, 2003) no gânglio da raiz posterior (neurônios mielinizadas e não mielinizadas), fato que sustenta a hipótese de que o TRPV1 possa estar envolvido com a dor aguda e crônica (Cortright, Szallasi, 2004; Zhou et al., 2008; Zhou, Zhou, Zhao, 2001).

Neste sentido, a ativação de TRPV1 desencadeia a propagação da sensação dolorosa que afetam desencadeamento da liberação de neurotransmissores, incluindo a substância P, que são

liberados a partir das terminações nervosas ativadas, resultando numa inflamação neurogênica (Pailleux, Lemoine, Beaudry, 2012).

A substância P (SP) é um neuropeptídeo que pertence a família das taquicininas como neurocinina (NK)A, NKB e SP. Este neuropeptídeo age em um receptor constituído de sete domínios transmembrânicos denominado, receptor NK1 pelo fato deste receptor ser preferencialmente encontrado no encéfalo, o qual está acoplado à proteína G. O estudo realizado por Hokfelt (1991) revelou que os neurônios não mielinizados (tipo C) do gânglio da raiz posterior possuem uma proporção de 50% de imunorreatividade para a SP (Bie, Zhao, 2011; Hökfelt, 1991). Outros estudos demonstram o envolvimento do receptor NK1 no modelo de dor neuropática por constrição do nervo isquiático, sugerindo que a SP é responsável pelo desenvolvimento da hipernocicepção em ratos (Jang et al., 2004; Lee, Kim, 2007) visto que, quando bloqueados os receptores para SP (NK1) o quadro de hipernocicepção é bloqueado (revertido) (Cahill,Coderre, 2002).

O papel da SP na dor é controverso. Estudos apontam para uma diminuição da expressão no DRG após lesão por axotomia (Sapunar et al., 2012; Ueda, 2006) e outros estudos demonstraram um aumento da expressão de SP no DRG após lesão parcial do nervo (Ma, Bisby, 1998). Estudos suportam que a SP desempenha um papel fundamental no processamento do estímulo doloroso na medula espinal, via receptor NK1 (Lagraize et al., 2010; Mansikka et al., 2000) e outros estudos demonstram que o receptor NK1 para SP e TRPV1 são coexpressos em neurônios do DRG, como consequência, um aumento de SP no DRG aumenta a sensibilidade para o TRPV1 (Zhang et al., 2007).

1.4 A influência do Sistema opióide endógeno no controle da dor

Os opióides são potentes analgésicos que exercem efeitos farmacológicos e fisiológicos devido a interação com receptores distribuídos em diversas regiões. Esses receptores são constituídos por sete domínios transmembrânicos e seu mecanismo de ação está associado a presença de proteína G inibitória, a qual quando ativada inibi a produção do AMP cíclico ou age diretamente sobre canais iônicos da membrana celular (canais de potássio e cálcio) diminuindo a excitabilidade neural, bem como a liberação de neuropeptídios como, por exemplo, SP e CGRP (Stein, Zöllner, 2009; Yaksh, 1988). Na literatura encontramos três subtipos de receptores opióides, são eles: MOR DOR e KOR todos amplamente distribuídos em diversos sistemas como

no sistema imunológico, neuroendócrino (pineal e supra-renal), em células ectodermal, sistema nervoso periférico e sistema nervoso central, modulando a dor e a inflamação (Zöllner, Stein, 2007).

No sistema nervoso periférico, os receptores MOR, DOR e KOR são encontrados no gânglio da raiz posterior (Coggeshall, Zhou, Carlton, 1997; Mansour et al., 1994). Os primeiros indícios sobre a participação desses receptores na analgesia periférica surgiu em 1987 por reduzir a hiperalgesia quando se aplicava um agonista para esses receptores, sugerindo uma diminuição das descargas espontâneas nas fibras do tipo C de neurônios aferentes primários (Russell, Schaible, Schmidt, 1987; Sánchez, Bagües, Martín, 2010; Tegeder et al., 2003).

Na década entre 1970 a 1980 surgiu a idéia sobre a participação de regiões encefálicas na modulação da aferência nociceptiva primária advinda do sistema nervoso periférico (Mayer et al., 1971). Diversos estudos apontam que a estimulação elétrica da PAG induz intensa analgesia em ratos (Mayer, Price, 1976; Mayer et al., 1971). A PAG se dispõe anatomicamente numa série de colunas neuronais longitudinais orientadas de forma rostrocaudal como, por exemplo, coluna dorsomedial (dm), coluna dorsolateral (dl), coluna lateral (lat), coluna medial e por fim, coluna ventrolateral (vl) (m) (Paxinos, Watson, 2006). A coluna ventrolateral da PAG ficou marcada por ser a principal região responsável pela produção e liberação de opióides endógenos (Basbaum, Fields, 1984) sendo uma região estabelecida para entender a relação do sistema inibitório descendente de dor (opióides endógenos) sobre a aferência nociceptiva primária em fibras C (Gebhart, 2004; Waters, Lumb, 2008). Além disso, a PAG possui neurônios de projeção excitatórios para a região da medula rostral ventromedial (RVM) local em que encontramos os núcleos: magno da rafe, núcleo reticular gigantocelular e gigantocelular lateral (Fields, Heinricher, Mason, 1991). Assim, impulsos advindos da PAG para a RVM são transmitidos para a medula espinal contralateral, via funículo dorsolateral (FDL) causando atenuação da aferência nociceptiva primária por meio ativação das células OFF (gabaérgica) e inibição das células ON (Wall, Melzack, 1999) devido modulação de interneurônios local em que opióides e substância P desempenham papel fundamental no controle direto e indireto sobre a modulação da dor (Pinto et al., 2008).

1.5 Tratamento da dor neuropática por Mobilização Neural

As opções terapêuticas para o controle da dor neuropática têm aumentado nos últimos anos (Galer, 1995). Entretanto a resposta dos pacientes com dor neuropática para muitos dos tratamentos

não é satisfatória. Os tratamentos utilizados na prática clínica incluem lesões neurocirúrgicas, tratamentos medicamentosos como, por exemplo, antidepressivos tricíclicos, anticonvulsionantes, administração sistêmica de anestésicos locais, agentes tópicos, analgésicos narcóticos e não narcóticos antiarrítmicos (Galer, 1995; Sah, Ossipo, Porreca, 2003) e tratamento não medicamentoso tal como fisioterapia. Um dos procedimentos utilizados por fisioterapeutas no combate a dor neuropática são as técnicas de Mobilização Neural (MOB), as quais clinicamente têm demonstrado excelente prognóstico em pacientes com este tipo de dor (Dwornik et al., 2007).

A MOB é uma técnica não invasiva aplicada por fisioterapeutas. A técnica visa restaurar a mobilidade e a elasticidade do sistema nervoso periférico por meio de tensões que são impostas aos troncos nervosos, raízes, nervos, medula espinal e seus respectivos envoltórios, as meninges, devido a oscilações e angulações articulares (Butler, 1991). Atualmente, a técnica vem sendo utilizada como método de avaliação e tratamento das mais diversas patologias que acometem o sistema nervoso central (acidente vascular encefálico) ou periférico (hérnias de disco ou pinçamento neural) e as estruturas por ele inervadas como, por exemplo, os músculos devido à integração existente entre aparelho locomotor e sistema nervoso (Dwornik et al., 2007, 2009; Teixeira, 2007; Sweeney, Harms, 1996).

A prova que existe uma integração entre sistema nervoso e aparelho locomotor é percebida quando certos movimentos combinados são executados, momento em que os nervos são levados a uma grande tensão, que é transmitida em direção as raízes nervosas e consequentemente, ao neuroeixo (Smaniotto, Fontequê, 2004). A integração pode ser melhor compreendida com a descrição do clássico teste de MOB de elevação da perna estendida (SLR - STRAIGHT LEG RAISE) onde, certamente os movimentos angulares das articulações tencionam os axônios que compõem nervo isquiático (figura 1).

Figura 1 - Mobilização Neural - Teste de elevação da perna estendida

Fonte: Butler, 1991.

Lew e Briggs (1997), para entender o conceito de integração entre sistema locomotor e sistema nervoso, dissecaram cinco cadáveres ainda não formalizados com o objetivo de avaliar a relação existente entre flexão da articulação do quadril e flexão cervical com a medula espinhal. Para isto, os autores dissecaram a região da terceira vértebra lombar (L3) para expor a medula espinhal. Após a exposição da medula espinhal, realizava-se flexão cervical, posteriormente flexão de quadril e flexão de ambos concomitantemente. Os autores concluíram que os movimentos de flexão cervical e flexão do quadril influenciam diretamente na medula espinhal devido à conexão existente entre o aparelho locomotor e com isso os autores sugeriram que esses movimentos devem ser combinados em determinados tipos de terapia (Lew, Briggs, 1997).

Além disso, durante a execução dos movimentos corporais os tecidos conjuntivos como, o endoneuro, o perineuro e o epineuro protegem os axônios das forças de tensão e compressão incidentes sobre os nervos periféricos e a relação sadia, longe de injúrias, entre nervos periféricos e aparelho locomotor em relação as suas interfaces teciduais permite aos indivíduos mover-se de forma livre e sem dor (Zamberlan, Kerppers, 2007).

Com o crescimento da reabilitação, em especial a fisioterapia, várias técnicas de terapia manual vêm sendo estudadas por pesquisadores como, por exemplo, Mobilização Maitland (Maricar, Shacklady, McLoughlin, 2009), Reeducação Postural Global (Vanti et al., 2007) e

inclusive a técnica de MOB que está aos poucos colhendo frutos de aquisição de novos conhecimentos como neurobiologia, biomecânica e fisiologia.

Injúrias como, por exemplo, compressão nervosa causa alteração mecânica (diminuição da elasticidade do nervo) das fibras nervosas ocasionando diminuição ao fluxo sanguíneo levando a uma isquemia e consequentemente lesão local (Butler, 1991).

A técnica de MOB restabelece às funções normais do tecido nervoso comprometido pela injúria. A pesquisa realizada por Dwornik et al., (2007) demonstra que a MOB é efetiva em condições de lesões musculoesquelética para conceder um diagnóstico funcional e patológico. No entanto, os autores mencionam que para cada condição musculoesquelética um tipo de manobra de MOB deverá ser realizado e por não ser uma técnica invasiva pode ser utilizada como terapêutica exclusiva, mas dependendo da situação clínica de cada paciente, outras terapias podem ser incluídas no plano de tratamento (Dwornik et al., 2007). O restabelecimento da mecânica neural (neurodinâmica) ocorre por meio de pequenas oscilações e tensão no tecido nervoso, que induz a melhora da dor e dos tecidos adjacente como, por exemplo, o aparelho locomotor. Desta forma a técnica melhora a qualidade de vida dos mais diversos pacientes com injúrias, por diminuir a dor (Dwornik et al., 2009), aumentar a perfusão do tecido nervoso, reduzir o edema do tecido nervoso, aumentar o transporte axonal ortodrômico e antidrômico, reduzir o tônus simpático, restaurar a função neuromecânica normal e restaurar a função fisiológica normal das células do tecido nervoso (Butler, 1991; Santos, 2004).

Ellis e Hing (2008) realizaram uma revisão sistemática a qual teve como objetivo avaliar a evidência clínica ou eficácia terapêutica da técnica de MOB em estudos randomizados controlados. Esta revisão destacou a escassez em quantidade e qualidade das pesquisas disponíveis sobre MOB na época e destaca a importância de novas pesquisas para comprovar a eficácia terapêutica desta técnica (Ellis, Hing, 2008).

Sweeney e Harms descreveram que a alodinia mecânica é bem documentada como problema clínico em pacientes com lesão dos nervos periféricos. Neste estudo, os autores mencionam que a MOB diminui a alodinia mecânica e aumenta a amplitude de movimento no membro comprometido. Os autores sugerem também, que a MOB é uma ferramenta útil na avaliação e no tratamento dos indivíduos com alodinia mecânica (Sweeney, Harms, 1996).

Oskay et al., (2010) observaram melhora da força muscular no membro superior, avaliada por dinamômetro, bem como, melhora da dor de pacientes com síndrome do túnel do carpo de leve a moderado (Oskay et al., 2010).

Atualmente, estudos buscam embasar cientificamente a técnica de MOB (Dwornik et al., 2009) (Godoi et al., 2010; Martins, 2009). Modelo experimental de isquiatalgia em ratos utilizou como tratamento a técnica de MOB e o alongamento estático para reduzir a dor neuropática dos ratos. Os autores concluíram que as duas formas de terapia foram eficazes na redução da dor, sendo a MOB mais efetiva (Bertolini et al., 2009). No entanto a técnica de MOB apesar de melhorar a qualidade de vida dos mais diversos pacientes com injúrias (Butler, 1991; Santos, 2004), ainda carece de pesquisa básica e/ou clínica com melhor qualidade metodológica, como randomização dos grupos, tempo de tratamento, amplitude de movimento e frequência de tratamento (Ellis, Hing, 2008; Walsh, 2005). Atualmente, estudos demonstram a eficácia da MOB tanto na pesquisa básica como clínica (Efstathiou et al., 2014; Marcioli et al., 2013; Saban, Deutscher, Ziv, 2014; Savva, Giakas, 2013; Schmid, Nee, Coppieters, 2013; Villafañe et al., 2012; Wong et al., 2013).

Assim, acreditamos que por meio da pesquisa básica (em animais) possamos elucidar os mecanismos de dor, e, principalmente, analgesia mediada por aplicação da técnica de MOB em pacientes com dor neuropática.

1.6 Justificativa e hipótese

Alternativas terapêuticas para o tratamento da dor neuropática se fazem necessárias, de modo que esta modalidade de dor não responde satisfatoriamente a nenhum tipo de intervenção convencional como cirurgias e/ou medicamentos. A fisioterapia tem demonstrado por meio da técnica de MOB ser eficiente no controle da dor neuropática, no entanto carece de estudos que fundamentem os mecanismos de ação que estão envolvidos com a melhora do quadro clínico de pacientes com neuropatia periférica. Neste sentido, este estudo torna-se importante, devido à escassez de estudos demonstrando a fundamentação teórica dos efeitos da técnica de MOB, uma vez que esta técnica é capaz de induzir analgesia no modelo de dor crônica em ratos, conforme artigo já publicado por nosso grupo de pesquisadores (Santos et al., 2012, 2014; Silva et al., 2014). Acreditamos que entendendo melhor os mecanismos envolvidos durante os processos de hipernocicepção e analgesia, dentre eles o envolvimento do receptor TRPV1, SP, ambos envolvidos com a formação de potenciais de longa duração e receptores opóides endógenos (MOR,

DOR e KOR) todos envolvidos com mecanismos endógenos de analgesia em ratos, estaremos contribuindo para o embasamento e o aperfeiçoamento da técnica de MOB. Ainda, estaremos elucidando os mecanismos envolvidos na dor neuropática. Assim, acreditamos que podemos contribuir de forma efetiva para os tratamentos clínicos empregados neste tipo de dor decorrente de lesões como, por exemplo, pinçamento de nervos, síndrome do túnel do carpo, entre outras síndromes compressivas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os efeitos da Técnica de MOB sobre as alterações periféricas e centrais em ratos *Wistar* submetidos à dor neuropática.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Induzir a neuropatia periférica em ratos *Wistar* e utilizar como procedimento terapêutico a técnica de MOB;
- ✓ Avaliar o comportamento funcional do animal;
- ✓ Analisar o impacto da neuropatia periférica e do tratamento com MOB sobre a força muscular;
- ✓ Analisar a regeneração do nervo isquiático;
- ✓ Analisar alterações na expressão dos receptores MOR, DOR e KOR bem como, do receptor TRPV1 e da Substância P nas células satélites dos gânglios das raízes posteriores de nervos espinais;
- ✓ Analisar alterações na expressão de receptores MOR, DOR e KOR da PAG.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, pesando entre 180-220 g (aproximadamente três meses). Todos os animais foram adquiridos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Posteriormente, os animais foram encaminhados e mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada localizada no Biotério do

departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro/escuro (12:12 h). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo, 091 na folha 131/ livro 02, da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do ICB. Todos os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção (Zimmermann, 1983).

3.2 Indução da dor neuropática

Para indução de dor foi utilizado o método descrito por Bennett e Xie (1988). Os animais foram anestesiados com Isoflurano e em seguida o nervo isquiático direito foi exposto na região intermédia da coxa, afastando-se o músculo bíceps femoral, músculo semitendíneo e músculo semimembranáceo. Próximo à trifurcação do nervo isquiático, 7 mm de distância da trifurcação, foram realizadas quatro ligaduras frouxas ao redor do nervo com fio categut cromado 4-0, distantes entre si em aproximadamente 1 mm. As ligaduras foram realizadas ao longo do nervo, até 4-5 mm do ponto inicial. A incisão foi suturada em camadas, utilizando fio de sutura de seda número 4-0 (figura 2). O grupo controle foi composto por animais falso operados, submetidos à mesma incisão que os animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem a amarradura ao redor do nervo (Bennett, Xie, 1988).

Figura 2 - Ilustração do modelo de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional da dor – Universidade de São Paulo – Departamento de Anatomia.

3.3 Planejamento dos grupos experimentais

Utilizamos um total de 100 animais, sendo 50 ratos para ensaio de *Western blot* (N=10/grupo) (figura 3), 25 animais para microscopia eletrônica de transmissão (N= 05/grupo) (Figura 4) e 25 animais para análise da função contrátil e IFC (N=05/grupo) (Figura 5). Os animais foram alocados conforme divisão de grupos abaixo. Todos os animais foram inicialmente submetidos aos testes comportamentais e de acordo com os tempos de tratamento os animais foram eutanasiados e a seguir, submetidos aos ensaios de *Western blot* e/ou microscopia eletrônica de transmissão.

- **Grupo 1: ratos controle (NAIVE):** animais sem nenhum tipo de lesão ou tratamento;
- **Grupo 2: (CCI MOB):** ratos com dor neuropática, tratados com MOB a partir do 14º dia após a cirurgia e eutanasiados após a 10ª sessão de MOB (34 dias após a CCI);
- **Grupo 3: (CCI):** ratos com dor neuropática (CCI - operado no mesmo dia do grupo 2), porém, **sem** tratamento com MOB, e eutanasiados 34 dias após a CCI;
- **Grupo 4: ratos controle (FOP MOB):** ratos falso operados, tratados com MOB a partir do 14º dia após procedimento cirúrgico e eutanasiados após a 10ª sessão de MOB (34 dias após o procedimento cirúrgico);
- **Grupo 5: ratos controle (FOP):** ratos falso operados, porém **sem** tratamento com MOB e eutanasiados 34 dias após ao procedimento cirúrgico.

Figura 3 - Representação esquemática dos animais utilizados para técnica *Western Blot*

ENSAIO DE WESTERN BLOT (N=10/GRUPO)												
DIAS - d	0	14d	2ºs	3ºs	4ºs	5ºs	6ºs	7ºs	8ºs	9ºs	10ºs	34d
SESSÕES - ºs		1ºs										
GRUPOS												
NAIVE												✕
CCI	↑											✕
CCI MOB	↑	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	✕
FOP	▲											✕
FOP MOB	▲	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	✕

LEGENDA:

↑ = Exposição do nervo isquiático com amarraduras - CCI

▲ = Exposição do nervo isquiático sem amarraduras - Falso operado

★ = Tratamento com Mobilização neural - MOB

✕ = Eutanásia dos animais e retirada de tecidos - DRG e PAG

Figura 4 - Representação esquemática dos animais utilizados para a técnica microscopia eletrônica de transmissão

ENSAIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (N=05/GRUPO)												
DIAS - d SESSÕES - °s	0	14d 1°s	2°s	3°s	4°s	5°s	6°s	7°s	8°s	9°s	10°s	34d
GRUPOS												
NAIVE												✕
CCI	↑											✕
CCI MOB	↑	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	✕
FOP	▲											✕
FOP MOB	▲	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	✕

LEGENDA:
 ↑ = Exposição do nervo isquiático com amarraduras - CCI
 ▲ = Exposição do nervo isquiático sem amarraduras – Falso operado
 ★ = Tratamento com Mobilização neural – MOB
 ✕ = Eutanásia dos animais e retirada de tecidos – DRG e PAG

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor – Universidade de São Paulo – Departamento de Anatomia.

Figura 5 - Representação esquemática dos animais utilizados para os ensaios do índice funcional do nervo isquiático e força muscular

ENSAIOS DE ÍNDICE FUNCIONAL E FORÇA MUSCULAR (N=5/GRUPO)												
DIAS - d SESSÕES - °s	0	14d 1°s	2°s	3°s	4°s	5°s	6°s	7°s	8°s	9°s	10°s	34d
GRUPOS												
NAIVE		○		○				○			○ ■	✕
CCI	↑	○		○				○			○ ■	✕
CCI MOB	↑	★ ○	★	★ ○	★	★	★	★ ○	★	★	★ ○ ■	✕
FOP	▲	○									○ ■	✕
FOP MOB	▲	★ ○	★	★ ○	★	★	★	★ ○	★	★	★ ○ ■	✕

LEGENDA:
 ↑ = Exposição do nervo isquiático com amarraduras - CCI
 ▲ = Exposição do nervo isquiático sem amarraduras – Falso operado
 ★ = Tratamento com Mobilização neural – MOB
 ○ = Avaliação por meio do índice funcional do nervo isquiático - IFC
 ■ = Avaliação da força muscular por meio do BIOPAC System
 ✕ = Eutanásia dos animais e retirada de tecidos – Nervo

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor – Universidade de São Paulo – Departamento de Anatomia.

3.4 Procedimento terapêutico – Técnica de Mobilização Neural

Para tratar os ratos que foram submetidos ao modelo de dor neuropática, utilizamos como modalidade terapêutica a técnica de MOB descrita por Butler em (1991) e adaptada em nosso laboratório (Neuroanatomia Funcional da Dor) (Santos et al., 2012) (figura 6).

Figura 6 - Ilustração do tratamento com a técnica de Mobilização Neural adaptada no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor – Universidade de São Paulo – Departamento de Anatomia.

Inicialmente os ratos foram anestesiados com Isoflurano com fluxo contínuo de oxigênio (5 l/ min) na posição de decúbito lateral esquerdo (figura 6). Após a anestesia, as articulações do quadril e joelho direito foram palpadas para dar início às angulações articulares (A). Em seguida, a articulação do joelho direito foi posicionada em extensão, permanecendo assim durante todo o tratamento (A). Além disso, a articulação do quadril direito foi flexionada até o momento em que era percebida uma resistência mínima da musculatura da região posterior de coxa e perna direita (A) (descartando o alongamento muscular). A terapia com MOB foi iniciada no momento em que a articulação do tornozelo direito passou a ser manipulada em dorsiflexão aproximadamente entre 20 oscilações por minuto, durante dois minutos, com pausa de 25 segundos para descanso com tempo total de tratamento de dez minutos (B-C). Nos últimos dois minutos de terapia, incluímos ao tratamento a flexão cervical, com a finalidade de tencionar o neuroeixo (D). A primeira sessão de MOB foi iniciada no 14º dia após indução da lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI), a seguir, os animais foram tratados em dias intercalados, ou seja, dia sim, dia não, somando um total de 10º sessões de MOB (34 dias após a CCI). Ao finalizar a 10º sessão de MOB, os animais foram eutanasiados (decapitação e perfusão transcardíaca) e os tecidos coletados para análise.

3.5 Avaliação da função locomotora pelo índice funcional do nervo isquiático (IFC)

Para avaliar a atividade funcional (locomotoção), utilizamos 25 animais (N=05/grupo). Todos submetidos ao IFC o qual avalia as pegadas dos animais (de Medinaceli, Freed, Wyatt, 1982). As

impressões das pegadas dos animais foram obtidas pelo método proposto por De Medinaceli e colaboradores (1982, 1984), que emprega tiras de papel impregnado com azul de bromofenol. Uma passarela (44 cm X 8,7 cm) foi construída em madeira, de acordo com De Medinaceli e colaboradores (1982, 1984), sendo fechada nas laterais e dotada de uma casinhola ao final, onde o animal procura se abrigar e encontrar alguns grãos de ração após percorrer todo seu comprimento (de Medinaceli, DeRenzo, Wyatt, 1984; Lowdon, Seaber, Urbaniak, 1988) (Figura 7).

Os animais foram treinados a caminhar na passarela previamente as medidas iniciais, e foram considerados aptos quando atravessaram a passarela, da abertura inicial até a casinhola, sem hesitar. Depois de adaptados, foram realizadas as medidas iniciais, onde os animais caminharam, com as patas traseiras umedecidas em água, sobre as folhas tingidas. Por meio das pegadas obtidas, os seguintes parâmetros foram mensurados (utilizando paquímetro eletrônico- MARCA - MYTUTOYO): (1) comprimento da pegada (PL, do inglês, print length); (2) espalhamento total dos dedos, do 1º ao 5º (TS, do inglês, total spread of toes); e (3) espalhamento dos dedos intermediários, do 2º ao 4º (IT, do inglês, intermediate toes). Estes dados foram coletados do lado normal (não operado – lado esquerdo) (NPL, NTS e NIT) e do lado experimental (operado – lado direito) (EPL, ETS e EIT) (figura 8).

Os dados obtidos foram analisados por meio da equação desenvolvida por De Medinaceli et al., (1982) e adaptada por Bain et al., (1989) e Hare et al., (1992) como se segue: $IFC = -38,3 \times [(EPL-NPL)/NPL] + 109,5 \times [(ETS-NTS)/NTS] + 13,3 \times [(EIT-NIT)/NIT] - 8,8$. Onde: N= Normal; E= Experimental; PL= Comprimento da pata; TS= Espalhamento total dos dedos; IT= Espalhamento dos dedos intermediários. Os resultados obtidos com esta equação são expressa num percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) (desvio padrão de -11 a 11) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. Todos os testes foram aplicados antes do procedimento cirúrgico para obtenção da medida inicial (MI), após 14 dias da lesão por constrição crônica do nervo isquiático para avaliar a intervenção cirúrgica e, na 3ª sessão, 7ª sessão e na 10ª sessão de MOB para avaliar o impacto desta técnica sobre a locomoção.

Figura 7 – Ilustração do índice funcional do nervo isquiático - Vista geral da passarela

Fonte: Laboratório Especial de Sinalização e Dor - Instituto Butantã

Figura 8 – Ilustração do esquema da impressão em papel da pata de um rato normal (A) e com lesão do nervo isquiático (B)

Fonte: (Reis et al., 2008)

3.6 Análise da função contrátil (força tetânica máxima do músculo tibial anterior)

Para este procedimento, utilizamos 25 animais (N=5/grupo). Cabe mencionar que foram os mesmos animais utilizados nos testes do IFC. Assim, 34 dias após aos procedimentos, todos os grupos foram anestesiados com Tribromoetanol (1 ml /100 g) e submetidos aos teste de força muscular. Para isso, uma incisão foi feita no tornozelo direito para a exposição do tendão do músculo tibial anterior direito. Em seguida, os animais foram colocados numa plataforma, local em que a pata direita foi estabilizada. O tendão intacto foi amarrado com uma linha (4-0) ao braço de alavanca de um servomotor (BIOPAC Systems, CA, EUA), que controlou o comprimento muscular e medio a força tetânica máxima gerada pelo músculo. O servomotor foi controlado pelo computador que moveu o braço de alavanca a uma distância previamente estabelecida e velocidade constante. O computador também coletou e analisou os dados de força. A pequena região de exposição do tendão foi mantida hidratada com solução salina (NaCl, 0,9%).

Para induzir a estimulação do músculo tibial anterior direito, o nervo isquiático direito foi exposto na região intermédia da coxa direita, afastando-se o músculo bíceps femoral, músculo semitendíneo e músculo semimembranáceo da coxa direita. Próximo à trifurcação do nervo isquiático, 7 mm de distância antes da trifurcação, o músculo tibial anterior direito foi ativado via nervo isquiático direito o qual foi cuidadosamente isolado e conectado a um eletroestimulador (BIOPAC Systems, CA, EUA). Uma duração de pulso de 0,2 ms foi utilizada para todas as contrações. A duração de trem de pulso de 3 ms e 300 ms foi utilizada nas contrações isoladas e tetânicas, respectivamente. A voltagem foi fixada a 6 V e ajustada com incrementos de 1 V até que a tensão isolada máxima foi atingida. O comprimento do músculo tibial anterior direito foi estabelecido com o joelho direito totalmente estendido e o tornozelo direito em dorsi-flexão e então ajustado em incrementos de 0,125 mm para tensão isolada máxima (McArdle et al., 2004) (figura 9).

Figura 09 – Ilustração da análise da função contrátil (BIOPAC Systems, CA, EUA)

Fonte: Laboratório de Plasticidade Músculo-Esquelética. Departamento de Anatomia – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão do nervo isquiático

Para a microscopia eletrônica de transmissão, utilizamos de forma exclusiva para estes ensaios, 25 os animais (N=5/grupo), todos anestesiados via intraperitoneal, com uretano (3 g / Kg), perfundidos com a solução fixadora Karnovsky modificada, contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH= 7,4 de acordo com a método utilizado por (Ciena et al., 2011). Após a dissecação dos músculos da região posterior da coxa, o nervo isquiático direito foi coletado. As amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% a 4 °C e posteriormente imersas em solução aquosa de acetato de uranila

5% em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescente de alcoóis, imersas em óxido de propileno e incluídas em resina Spurr. Cortes semifinos foram realizados no ultra-micrótomo Reichert Ultra Cut ® e corados com a solução de azul de toluidina 1%, para verificação da área a ser analisada. Posteriormente, foram realizados os cortes ultra-finos de 60 nm, coletados em telas de cobre de 200 "mesh" (Sigma ®) e contrastados com a solução de acetato de uranila 4% e solução aquosa de citrato de chumbo 0,4% conforme foi relatado por Watanabe e Yamada (1983) (Watanabe I, 1983). As telas foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010, do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

3.8 Ensaio de *Western blot*

Para os ensaios de *Western blot* utilizamos 50 animais exclusivamente (N=10/grupo). Os animais foram alocados aos grupos e submetidos aos procedimentos cirúrgicos e/ou terapêuticos, sendo sacrificados (utilizando guilhotina), após todos os procedimentos (34 dias), para a retirada dos tecidos. Os gânglios das raízes de L4-L6 (do lado direito) e a PAG, integralmente, dos animais experimentais (CCI e CCI MOB) e controle (FOP, FOP MOB e NAIVE) foram retirados para análise.

O conteúdo protéico do material isolado dos animais foi dosado pelo método de Bradford (Amresco, U.S.A) (Bradford, 1976). Após a quantificação de proteína total pelo método de Bradford, as amostras dos gânglios das raízes posteriores (L4-L6) e PAG foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE. Os materiais foram diluídos em um mesmo volume de tampão Tris/HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2,5% (p/v) de SDS, 2,5% de 2-mercaptoetanol (2-ME), 4 mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol, e as amostras foram posteriormente fervidas em banho Maria por cinco minutos. O material foi aplicado num gel de poliacrilamida a 12% e submetido à eletroforese com corrente constante de 25 mA (Laemmli, 1970). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2 um de diâmetro) de acordo com a técnica descrita por Towbin et al., (1979). Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Após bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé) 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,5), por duas horas, as membranas foram incubadas, por 18 horas a 4 °C, com anticorpos monoclonais específicos para TRPV1 (1:1000 - Santa Cruz – Biotechnology – Santa Cruz, CA),

Substance P (1:1000 – Millipore Corporation), Anti-MOR ou (μ), DOR ou (δ) e KOR ou (k) (todos 1:1000 - Abcam)(Chuhma et al., 2011; Kabli, Cahill, 2007). Em seguida, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase de raiz forte (goat anti rabbit HRP IgG (1:5.000; Chemicon). O controle endógeno foi marcado com β -actina (1:10000, Sigma), e ao término as membranas foram lavadas novamente com solução basal. Após a lavagem as membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL (Amershan Biosciences, NJ/EUA) de quimioluminescência e analisadas quanto à densidade óptica das bandas marcadas, utilizando o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD/EUA), e corrigido pela densidade óptica para a β -actina, considerando as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados.

3.9 Análise estatística

Os dados estão representados como média $\pm$ E.P.M. A análise estatística foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5 (utilizando-se GraphPad Software Inc., CA, USA). A comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O índice de significância foi considerado de $p \leq 0,05$ (Sokal, Rohlf, 1981).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da função locomotora

Observamos no 14º dia (14 d) que os animais dos grupos CCI e CCI MOB descarregavam parcialmente o peso corporal sobre a pata direita (operada) refletindo em completa adução dos dedos e flacidez. Estas alterações foram representadas por uma diminuição dos valores no IFC quando avaliados no 14 d ao compararmos com as medidas iniciais e com os grupos controle: Falso operado (FOP e FOP MOB) e NAIVE os quais não apresentaram alterações nos valores do IFC. Cabe lembrar que a diminuição observada no índice funcional no grupo CCI se manteve no decorrer de todas as medidas de avaliação da locomoção até a data de sacrifício (Figura 10). No entanto, no decorrer dos tratamentos com MOB os animais demonstraram um aumento dos valores para próximo de zero no IFC, representando uma melhora da locomoção dos animais. Com relação aos grupos controle, falso operados (FOP e FOP MOB) e NAIVE ambos se mantiveram com valores

próximos aos das medidas iniciais, não apresentando alterações significativas no IFC (Figura 10). É importante ressaltar que a disfunção na deambulação é caracterizada pela CCI.

Figura 10 – Índice funcional do nervo isquiático

Disfunção motora induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI). A avaliação funcional foi avaliada pelo índice funcional do nervo isquiático (IFI). O resultado obtido, expressa um percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de cinco animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação ao grupo CCI. # < 0.05 em comparação ao grupo CCI MOB. & < 0.05 em comparação a medida inicial.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas

4.2 Análise da função contrátil

Para obtenção da força muscular tetânica máxima do músculo tibial anterior direito os grupos NAIVE, CCI, CCI MOB, FOP e FOP MOB, foram submetidos aos ensaios de análise da função contrátil, 34 dias após os procedimentos experimentais, conforme descrito material e métodos. Nossos resultados demonstram que a força tetânica máxima do músculo tibial anterior do grupo CCI quando comparado ao grupo NAIVE teve um queda de 52%. Entretanto o grupo CCI MOB demonstrou um aumento da força tetânica máxima do músculo tibial anterior direito de 172% quando comparado ao grupo CCI e uma queda de 10% quando comparado ao grupo NAIVE (figura 11). Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos falso operados em comparação ao grupo NAIVE e no grupo CCI MOB em relação aos controles.

Figura 11 - Análise da força muscular tetânica máxima do músculo tibial anterior

O resultado obtido expressa um percentual em gramada força muscular tetânica máxima do m. tibial anterior direito. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de cinco animais por grupo. ** $p < 0.001$ comparação entre CCI x controles (NAIVE, FOP E FOP MOB); * $p < 0.001$ por comparação com os grupos CCI MOB e CCI.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas

4.3 Avaliação da estrutura do nervo isquiático

Observamos por meio de fotomicrografia eletrônica de transmissão a morfologia ultraestrutural do nervo isquiático direito dos animais: NAIVE, CCI, CCI MOB e FOP MOB. Os grupos NAIVE e FOP MOB demonstram fibras intactas, com distribuição semelhante das fibras não mielínicas de pequenos e grandes diâmetros e fibras e núcleos das células de Schwann (Fig. 12A-D). No grupo CCI a estrutura interna do nervo foi extremamente danificada pelo processo de degeneração Walleriana, a qual é caracterizada por desmielinização e degeneração axonal, conversão do citoesqueleto axonal para debris granular, resíduos da mielina não digerida e ativação de macrófagos com presença de gotículas de lipídios (Fig. 12E-F). No grupo CCI MOB observamos regeneração da bainha de mielina em estágio avançado com grande quantidade de bainha regenerada ou em processo de regeneração. Áreas de debris estão limpas e brotos de regeneração estão presentes (Fig. 12G-H).

Figura 12 - Microscopia Eletrônica de Transmissão do nervo isquiático

Fotomicrografia eletrônica de transmissão do nervo isquiático direito. O grupo NAIVE (A-B) e o grupo FOP MOB (C-D) demonstram distribuição regular de fibras não mielinizadas indicadas por setas e núcleos das células de Schwann indicadas por asterisco (*). Observamos ainda distribuição regular de fibra de neurônios não mielinizados (cabeça de seta). No grupo submetido a CCI (E-F) a figura demonstra a estrutura do nervo em intenso processo de degeneração Walleriana, demonstrando degeneração axonal (pontas de setas), e a formação de novos brotamentos (*). Observamos ainda a ativação de macrófagos preenchidos com gotículas de lipídios (Setas). No grupo CCI MOB (Yu *et al.*) a figura demonstra uma intensa regeneração das fibras não mielínicas (ponta de setas) e mielínicas (setas largas) demonstrando processo de regeneração. Também foi observado novos brotos agrupados (setas pequenas). Escala Bar: A, C-E and G: 10µm; B and F: 5µm; H: 2µm.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas

4.4 Efeitos da Mobilização Neural nos parâmetros moleculares

4.4.1 SP no DRG - segmento L4- L6

No DRG, do lado direito, observamos um aumento de 48% ($p < 0.05$) e 50% ($p < 0.05$), da densidade óptica das bandas marcadas com SP no grupo CCI quando comparado com os grupos NAIVE e FOP, respectivamente. O grupo CCI MOB teve uma diminuição de 65% ($p < 0.001$) da SP imunorreativa quando comparado com os animais do grupo CCI. Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos NAIVE e FOP (Figura 13) e nem entre os grupos FOP e FOP MOB (dados não mostrados).

Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo ($n=10$).

Figura 13 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão da Substância P no gânglio da raiz posterior de ratos

Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação entre os grupos CCI e demais grupos. ***($p < 0.001$) por comparação entre os grupos CCI MOB e CCI.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.4.2 TRVP 1 no DRG - segmento L4- L6

No DRG, do lado direito, observamos um aumento de 35% ($p < 0.05$) e 50% ($p < 0.05$) da densidade óptica das bandas marcadas com TRPV1 no grupo CCI quando comparado com os grupos NAIVE e FOP, respectivamente. Quando os animais foram tratados com MOB, observamos uma diminuição de 80% e 60% na expressão do TRPV1 em comparação com os grupos controle NAIVE E FOP, respectivamente e uma diminuição de 110% ($p < 0.001$) quando comparamos com o grupo CCI (Figura 14). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos NAIVE e FOP (figura 14) e nem entre os grupos FOP e FOP MOB (dados não mostrados). Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo ($n=10$).

Figura 14 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão do TRPV1 no gânglio da raiz posterior de ratos

Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação entre CCI e demais grupos.

*** $P < 0.001$ por comparação entre os grupos CCI MOB e demais grupos

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

4.4.3 MOR no DRG - segmento L4- L6

Observamos um aumento de 110% ($p < 0.001$) e 115% ($p < 0.001$) da densidade óptica das bandas marcadas com MOR no grupo CCI quando comparado com os grupos controle NAIVE e FOP, respectivamente. O grupo tratado CCI MOB teve um aumento de 200% e 205% $p < 0.001$ em comparação aos grupos NAIVE e FOP, respectivamente e um aumento de 43% ($p < 0.01$) quando comparamos o grupo CCI. Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos NAIVE e FOP (Figura 15). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos FOP e FOP MOB (dados não mostrados). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo ($n=10$).

Figura 15 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de MOR no gânglio da raiz posterior de ratos

Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. *($p < 0.001$) por comparação entre os grupos CCI e controles (NAIVE e FOP). ** ($p < 0.01$) por comparação entre CCI MOB e demais grupos.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

4.4.4 DOR no DRG - segmento L4- L6

No DRG, não foi observado diferença estatística da densidade óptica das bandas marcadas com DOR, em todos os grupos analisados (Figura 16). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo ($n=10$). Nenhuma diferença foi observada para β-actina entre os grupos analisados.

Figura 16 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de DOR no gânglio da raiz posterior de ratos

Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

4.4.5 KOR no DRG - segmento L4- L6

No DRG, não foi observado diferença estatística da densidade óptica das bandas marcadas com KOR, em todos os grupos analisados (Figura 17). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo ($n=10$). Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Figura 17 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de KOR no gânglio da raiz posterior de ratos

Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

4.4.6 MOR na PAG

Na PAG, não foi observado diferença estatística da densidade óptica das bandas marcadas com MOR, em todos os grupos analisados (Figura 18). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo (n=10). Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Figura 18 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de MOR na substância cinzenta periaquedutal

Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor, Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

4.4.7 DOR na PAG

Observamos uma diminuição de 53% ($p < 0.001$) e 47% ($p < 0.001$) da densidade óptica das bandas marcadas com DOR no grupo CCI quando comparado com os grupos controle NAIVE e FOP, respectivamente. O grupo CCI MOB teve um retorno para níveis basais em comparação aos grupos controle e um aumento de 50% ($p < 0.001$) quando comparamos ao grupo CCI. Nenhuma diferença foi encontrada entre NAIVE e FOP MOB (Figura 19) ou entre os grupos FOP e FOP MOB (dados não mostrados). Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados. Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo (n=10).

Figura 19 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de DOR na substância cinzenta periaquedutal de ratos

Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0.001$ por comparação entre os grupos CCI e demais grupos.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

4.4.8 KOR na PAG

Observamos uma diminuição de 23% ($p < 0.05$) e 19% ($p < 0.05$) da densidade óptica das bandas marcadas com KOR no grupo CCI quando comparado com os grupos controle NAIVE e FOP, respectivamente. O grupo CCI MOB teve um aumento de 17% ($p < 0,05$) e 21% ($p < 0,05$) em comparação aos grupos NAIVE e FOP, respectivamente e um aumento de 40% ($p < 0.01$) quando comparamos com o grupo CCI. Nenhuma diferença foi encontrada entre NAIVE e FOP MOB (Figura 20) ou entre os grupos FOP e FOP MOB (dados não mostrados). Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo ($n=10$).

Figura 20 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na expressão de KOR na substância cinzenta periaquedutal de ratos

Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação entre os grupos CCI e controles (NAIVE e FOP). ** $P < 0.01$ por comparação entre CCI MOB e demais grupos.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional Dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho vem sendo avaliar a eficácia da técnica de MOB no controle da dor neuropática e nos efeitos da hipernocicepção em compressões do nervo isquiático de rato. Os métodos escolhidos no presente projeto de pesquisa para avaliar os efeitos da MOB sobre a dor neuropática foram: o de lesão constritiva crônica (CCI) que consiste de quatro amarraduras frouxas ao redor do nervo isquiático (Bennett, Xie, 1988), a técnica de MOB (Butler, 1991) adaptada no laboratório de Neuroanatomia funcional da dor para pesquisa básica (Santos et al., 2012), o IFC para avaliar o impacto da lesão (CCI) e do tratamento (MOB) sobre recuperação funcional, bem como o sistema Biopac System para avaliar o impacto da CCI e da MOB sobre a força muscular tetânica máxima.

Cabe ressaltar que, em decorrência da semelhança anatômica com o nervo isquiático de humanos, modelos experimentais de compressão deste nervo em ratos, como o realizado no presente estudo, estão sendo utilizados para avaliar a dor neuropática e seu controle, bem como a regeneração do tecido nervoso. Após a lesão de um nervo periférico vários eventos complexos são observados, dentre eles: o processo regenerativo se manifestam de maneira organizada, e são caracterizados por fagocitose dos axônios em degeneração, proliferação das células de *Schwann*, síntese de fatores de crescimento no coto distal, entre outros. Esses eventos favorecem a formação de um microambiente adequado para o crescimento axonal, bem como a capacidade intrínseca dos neurônios de desenvolverem uma resposta regenerativa após a lesão (Fawcett, Keynes, 1990).

Neste sentido, nossos resultados sobre o IFC demonstraram que os animais lesionados apoiavam parcialmente o peso corporal sobre a pata direita (operada) e completa adução dos dedos além de flacidez quando avaliados no 14º dia após CCI. Esta resposta está baseada em medidas representadas por uma diminuição dos valores no IFC ao compararmos com as medidas iniciais e com os grupos controle, os quais não apresentaram alterações nos valores do referido teste. No entanto, os animais do grupo CCI MOB, quando submetidos aos ensaios do IFC demonstraram um retorno dos valores para próximo de zero, ao término da última sessão, representando uma melhora da disfunção locomotora induzida pela CCI. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com achados na literatura em que também demonstraram a degeneração Walleriana após a CCI por meio de imunofluorescência, imunohistoquímica e morfometria do nervo isquiático (Campana et al., 2006; Ramer, French, Bisby, 1997; Wagner, Heckman, Myers, 1998). Tentando entender como a MOB melhora a disfunção locomotora, avaliamos a regeneração nervosa.

Nossos dados sugerem que a MOB ajuda a preservar a bainha de mielina, acelera a regeneração do nervo isquiático, protege os axônios mielinizados dos efeitos da lesão e ainda reduz ou previne a degeneração Walleriana, conforme visualizado na figura 10 na seção de resultados (Silva et al., 2014). Dados da literatura demonstram um aumento da densidade óptica para proteína zero após a MOB (Silva et al., 2014), a qual é a principal proteína das células de Schwann responsáveis pela produção da bainha de mielina nos nervos periféricos (Rotenstein et al., 2008). Neste sentido, nossos achados corroboram também com os dados descritos por Martins et al., (2009) em que os autores relataram que a técnica de MOB é capaz de melhorar a disfunção locomotora, bem como a regeneração do nervo isquiático após lesão por esmagamento.

Com relação aos estudos sobre o impacto da técnica de MOB na força muscular de ratos com dor neuropática, nossos resultados demonstram que a força tetânica máxima do músculo tibial anterior no grupo CCI quando comparado ao grupo NAIVE teve uma queda. Entretanto o grupo CCI MOB demonstrou um aumento da força tetânica máxima do músculo tibial anterior quando comparado ao grupo CCI e uma queda quando comparado ao grupo NAIVE. Na literatura encontramos que o modelo de lesão por CCI induz a uma queda na força muscular devido a degeneração de axônios de neurônios motores que constituem o nervo espinal, fato que induz a alterações nas fibras musculares como atrofia (Daemen et al., 1998). Outros estudos também demonstram que a MOB é efetiva para o ganho de força muscular (Villafañe et al., 2012).

Poucos estudos foram encontrados avaliando o efeito da técnica de MOB sobre a força muscular de ratos e/ou humanos com lesão periférica. No estudo realizado por Mallmann et al., (2012) os autores avaliaram a eficácia da técnica de MOB na manutenção do trofismo muscular após lesão por CCI. Neste estudo, os autores identificaram que o grupo CCI quando tratado com MOB manteve o trofismo muscular em comparação a grupo lesão não tratado, quando avaliados por ensaios histomorfométricos (Mallmann et al., 2012).

No estudo realizado por Lopes et al., (2010) os autores compararam a influência do alongamento muscular e da técnica de MOB na força muscular isométrica do músculo quadríceps femoral. Os voluntários foram avaliados por meio de um aparelho de eletromiografia. Segundo os autores, houve uma melhora significativa da força muscular no grupo submetido à MOB em relação aos demais grupos. Cabe mencionar que, os voluntários foram submetidos a apenas um minuto (equivalente a 20 oscilações) de MOB e a três alongamentos de 30 segundos cada (Lopes et al., 2010). Nossos resultados corroboram com esses achados, uma vez que após as dez sessões de dez

minutos cada, em dias intercalados como descrito detalhadamente no material e método, a técnica de MOB foi capaz de aumentar força tetânica máxima do músculo tibial anterior em relação ao grupo não tratado. Na literatura, encontramos estudos comprovando que a Técnica de MOB tem influência no tecido muscular (Castilho et al., 2012). Esta ferramenta de avaliação vem sendo utilizada em ratos com CCI tratados com MOB (Santos et al., 2014) além de ser utilizada em outros modelos experimentais como, nos estudos realizados por Miyabara et al., (2010) e Conte et al., (2011) em modelos de criolesão do músculo sóleo para avaliar a força muscular após tratamento que induz a regeneração deste tipo de tecido (Conte et al., 2011; Miyabara et al., 2010).

Considerando que a dor neuropática é de difícil tratamento e normalmente refratária as diferentes fármacos, terapias alternativas para combater a dor neuropática se tornam necessárias (Santos et al., 2014). A reabilitação física, por meio da fisioterapia, em especial a MOB, técnica não invasiva e sem efeitos secundários, tem contribuído fortemente como uma ferramenta analgésica para diversos paciente e ratos com dor neuropática (Bertolini et al., 2009; Butler, 1991; Dario et al., 1998; Ellis, Hing, 2008; Santos et al., 2012, 2014; Silva et al., 2014).

Sobre os aspectos celulares envolvidos com a aplicação da técnica de MOB, nossos resultados demonstram uma diminuição da expressão de Substância SP e de TRPV 1 no DRG de animais com lesão do nervo isquiático que foram tratados com MOB quando comparamos com o grupo de animais NAIVE, sugerindo que tanto a SP quanto o TRPV1 estão envolvidos com a formação de potenciais de longa duração (LTP) no DRG de ratos com hipernocicepção.

No estudo realizado por nosso grupo de pesquisadores (Santos et al., 2012), identificamos que a MOB em ratos com CCI é capaz de diminuir a expressão de NGF no DRG, bem como reversão da hiperalgesia térmica, mecânica e alodinia sugerindo a participação do NGF na modulação da hipernocicepção no DRG de ratos (Santos et al., 2012). Nossos resultados atuais complementam os achados de Santos et al., 2012 uma vez que observamos um aumento SP no gânglio da raiz posterior dos animais com CCI em comparação aos grupos controles e uma redução nos grupos tratados com a MOB quando comparado com os animais do grupo CCI.

Estudos demonstram que a SP está envolvida com o desencadeamento da nocicepção sendo um importante marcador de hipernocicepção em modelos animais (Ma, Bisby, 1998; Pennefather et al., 2004). Ainda, sob condições normais, a SP é expressa somente em neurônios do DRG TrkA-positivos, ou seja, neurônios que possuem receptor para NGF (Pennefather et al., 2004). Em condições nociceptivas a SP encontra-se aumentada nestes neurônios sendo liberada nas lâminas I

e II da coluna posterior da medula espinal que por sua vez sensibilizará neurônios sensoriais secundários (Pennefather et al., 2004). Acreditamos que a técnica de MOB induz analgesia por diminuir o NGF no DRG como demonstrado anteriormente no estudo de (Santos et al., 2012) bem como, por reverter para níveis basais a SP, como demonstrado neste estudo, uma vez que existe uma relação do receptor TrkA de NGF para a SP. Além disso, sugere-se que o decréscimo de SP após tratamento com MOB provavelmente impede ou reverte a formação dos potenciais de longa duração (LTP) e, conseqüentemente, leva a uma redução da hiperalgesia em ratos, uma vez que em resposta a um estímulo nocivo, a SP é liberada a qual estimula os neurônios de segunda ordem localizados na medula espinal sensibilizando assim, a via nociceptiva.

Além disso, já é sabido que após a lesão tecidual ocorre a liberação de diversas substâncias como, por exemplo, ácido araquidônico, bradicinina, histamina, serotonina, prostaglandina e NGF, que de um modo geral, interagem com receptores ou canais iônicos de fibras nociceptivas potencializando a sinalização do sinal doloroso. Neste sentido, essas substâncias nociceptivas, em especial, o NGF, potencializa a ativação dos receptores de TRPV 1, aumentando a sensibilidade dolorosa (hiperalgesia). Há ainda liberação de SP, CGRP (neuropeptídeo geneticamente relacionado ao gene da calcitonina) e ATP, todos contribuindo para um reforço do processo inflamatório devido ao aumento da vasodilatação, do edema e da histamina (Purves, Dalmaz, 2005).

Por este motivo, sabendo da relação existente entre TRPV1 e NGF outra questão importante levantada pelo nosso grupo de pesquisadores foi verificar o possível envolvimento dos receptores de TRPV1 existentes no DRG de animais com CCI submetidos aos tratamentos de MOB, uma vez que estudos anteriores, também utilizando o modelo experimental de CCI e MOB como terapia, foi observado aumento do NGF após a indução de dor neuropática e diminuição do NGF após o tratamento com MOB (Santos et al., 2012) reforçando a idéia da relação NGF e TRPV 1, como descrito anteriormente.

É importante ressaltar que, nossos estudos demonstraram um resultado semelhante ao observado com a SP, ou seja, ocorreu um aumento da expressão de TRPV1 após a CCI em comparação aos grupos controles e uma diminuição no grupo CCI MOB no DRG em comparação aos mesmos controles. Atualmente sabe-se que este receptor responde também a outros estímulos como, por exemplo, agentes pró inflamatórios endógenos como o ATP, bradicinina, histamina, prostaglandina, fosfolipases, proteases, NGF, além de alterações de pH provocados por lesões (pH

5,2), bem como, alteração da temperatura corporal ($>43^{\circ}\text{C}$) estímulos estes que ativam a fosfolipase C, responsável pela redução do limiar de nociceptivo (Chuang et al., 2001; Purves, Dalmaz, 2005; Zhang et al., 2005).

Nossos resultados demonstram uma importante modulação dos receptores de TRPV1 em ratos com dor neuropática tratados com MOB. Estudos envolvendo o receptor TRPV1 sustentam a possibilidade da participação deste receptor como alvo terapêutico para a dor (Cortright, Szallasi, 2004). Outros estudos comentam que os receptores de TRPV1 são modulados por neurotransmissores, pequenas proteínas ou peptídeos, quimiocinas e citocinas, além de fator de crescimento os quais quando inibidos melhoram a hiperalgesia (Ma, Quirion, 2007), podendo esses receptores ser alvos terapêuticos para o tratamento de dor (van Sloten et al., 2011). Nossos achados corroboram com os estudos de Ma e Quirion, 2007 em que os autores mencionaram a modulação dos receptores de TRPV1 por fator trófico, bem como corrobora ainda com o estudo de Santos et al., 2012 em que observaram uma melhora da hiperalgesia associada com a redução do fator de crescimento neural no DRG após a MOB em ratos com dor neuropática (Ma, Quirion, 2007; Santos et al., 2012). No entanto, Marcioli et al., (2013) não observaram melhora da hipernocicepção em ratos com lesão do nervo mediano após tratamento com a Técnica de MOB (Marcioli et al., 2013), contradizendo o estudo (Kavlak, Uygur, 2011).

Na literatura, encontramos estudos demonstrando que o aumento de MOR no DRG de ratos suprime a atividade dos receptores de TRPV1, indicado que os opióides podem modular a hiperalgesia por meio da inibição de TRPV1 (Endres-Becker et al., 2007). Neste sentido, surgiu o objetivo de avaliar o envolvimento dos opióides no DRG e na PAG. Assim, identificamos no gânglio da raiz posterior um aumento expressão de MOR nos animais com CCI, em comparação aos controles e um aumento ainda maior após tratamento com Mobilização em comparação aos mesmos controles.

Na PAG, não encontramos alterações estatísticas para o MOR neste modelo. Por outro lado identificamos a participação dos receptores KOR e DOR, ambos obtiveram aumento na expressão após o tratamento como MOB.

Sobre os opióides, encontramos na literatura que são potentes analgésicos e que exercem efeitos farmacológicos e fisiológicos devido à interação com receptores opióides distribuídos em diversas regiões. Além disso, esta terapia não farmacológica (MOB) retornou para níveis basais a expressão de DOR e aumento a expressão de KOR na PAG, o que sugere que estes efeitos podem

induzir analgesia em conjunto com o aumento de MOR no gânglio da raiz posterior, reforçando assim o mecanismo de analgesia. Em relação à não participação dos receptores MOR em nosso modelo é intrigante. Diferentes estudos mostraram resultados distintos em relação a vários tipos de receptores opióides. Konno et al., (2008) mostraram o envolvimento de receptores KOR no efeito antinociceptivo induzido por peptídeos nociceptivos; prostaglandina E2 e carragenina (Konno et al., 2008). Além disso, outros estudos também demonstraram diferença na expressão de opióides; estudos mostraram um envolvimento apenas dos receptores KOR e DOR em um modelo de dor por câncer (Brigatte et al., 2007), e em modelo com utilização de veneno crotálico em ratos (Coggeshall, Zhou, Carlton, 1997) ambos os autores não observaram a participação do receptor MOR em seus estudos. Esses dados corroboram com os nossos achados, em que não observamos participação do MOR na PAG em nosso modelo (Santos et al., 2014).

Além disso, os estudos mostraram que a expressão do receptor opióide é distintamente regulada pela presença de lesão aguda ou crônica, como por exemplo, prostaglandina E2 aumenta a expressão e a atividade (por meio de agonistas seletivos) do receptor opióides MOR e KOR no DRG e no nervo de ratos, porém diminui a expressão e atividade do receptor DOR. Por outro lado, a injúria por contração crônica aumenta a expressão do receptor de opióide DOR no DRG de ratos (Zambelli et al., 2014). Receptores opióides também são expressos em regiões do cérebro que modulam a nocicepção, incluindo córtex cingulado anterior, tálamo e PAG (Wang et al., 2009). Estas áreas possuem ligações anatômicas e envolvimento em estados de dor crônica (Hoot et al., 2011). Esta hipótese foi confirmada por estudos anteriores que demonstram que a analgesia por meio de técnicas não invasivas é mediada por mecanismos neuronais correlacionados com o sistema nervoso central, principalmente com opióides endógenos e mecanismos inibitórios descendente (Galdino, Duarte, Perez, 2010; Smith, McClean, Bryant, 2004; Stagg et al., 2011). Além disso, a importância da PAG no sistema inibidor é também caracterizada por estudos com a administração de DAMGO (um agonista do MOR) e DPDPE (um agonista do receptor DOR), que foram capazes de atenuar os sintomas de dor neuropática em ratos; em contraste, a naloxona (antagonista de opióides, administrada) reverte estes efeitos (Sohn et al., 2000).

Além disso, os opióides diminuem a excitabilidade neural e a liberação de SP (Stein, Zöllner, 2009; Yaksh, 1988) bem como de TRPV1 (Endres-Becker et al., 2007). Estudos apontam para uma redução da hiperalgesia quando se aplica um agonista para esses receptores, sugerindo uma diminuição das descargas espontâneas nas fibras do tipo C de neurônios aferentes primários

(Russell, Schaible, Schmidt, 1987; Sánchez, Bagües, Martín, 2010; Tegeder et al., 2003). Assim, sugerimos que a MOB estaria aumentando a liberação de opióide, consequentemente levando a inibição de TRPV 1 e SP levando assim, a diminuição de da LTP com consequente modulação da plasticidade sináptica promovendo uma reversão da dor neuropática.

6 CONCLUSÃO

Assim, até o presente momento, podemos sugerir que a técnica de MOB contribui para a reversão da disfunção locomotora induzida pela dor neuropática (CCI). Contribui também para o aumento da força muscular e participa da reparação do nervo isquiático de ratos com neuropatia periférica devido a um intenso processo de regeneração neural. Sugerimos também que a MOB induz analgesia em ratos com CCI por modular a expressão de SP e do TRPV 1 no gânglio da raiz posterior. Além disso, acreditamos ainda que a técnica de MOB estimula à liberação de opióides endógenos no gânglio da raiz posterior, causando uma diminuição das descargas espontâneas nas fibras do tipo C de neurônios aferentes primários que fazem sinapse na medula espinal, reforçando a analgesia em ratos com CCI. Outro ponto de grande relevância, é que a Técnica de MOB possui uma participação importante na PAG, ativando possivelmente o sistema inibitório descendente de dor, provavelmente por meio do aumento da expressão de KOR e DOR em relação ao CCI, mas não pelo MOR neste modelo.

REFERÊNCIAS*

- Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience*. 2002;111(2):389-97.
- Backonja MM. Defining neuropathic pain. *Anesth Analg*. 2003;97(3):785-90.
- Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual review of neuroscience*. 1984;7(1):309-38.
- Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain*. 1991;47(3):359-67.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscience* Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.
- Bertolini GR, Silva TS, Trindade DL, Ciena AP, Carvalho AR. Neural mobilization and static stretching in an experimental sciatica model: an experimental study. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. 2009;13(6):493-8.
- Bie B, Zhao ZQ. Peripheral inflammation alters desensitization of substance P-evoked current in rat dorsal root ganglion neurons. *European Journal of Pharmacology*. 2011;670(2-3):495-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- Brigatte P, Sampaio SC, Gutierrez VP, Guerra JL, Sinhorini IL, Curi R, Cury Y. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. *The Journal of Pain*. 2007;8(5):412-21.
- Butler DS. *Mobilisation of the Nervous System*. Singapore: Churchill Livingstone; 1991.
- Cahill CM,Coderre TJ. Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre-or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist. *Pain*. 2002;95(3):277-85.
- Campana WM, Li X, Shubayev VI, Angert M, Cai K, Myers RR. Erythropoietin reduces Schwann cell TNF - α , Wallerian degeneration and pain - related behaviors after peripheral nerve injury. *European Journal of Neuroscience*. 2006;23(3):617-26.
- Castilho J, Ferreira LAB, Pereira WM, Neto HP, Morelli JGdS, Brandalize D, Kerppers II, Oliveira CS. Analysis of electromyographic activity in spastic biceps brachii muscle following neural mobilization. *Journal of bodywork and movement therapies*. 2012;16(3):364-8.
- Chuang H, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4, 5) P~ 2-mediated inhibition. *Nature*. 2001;411(6840): 957-61.

*De acordo com:

International Committee of Medical journal editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscript submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Chuhma N, Tanaka KF, Hen R, Rayport S. Functional connectome of the striatal medium spiny neuron. *The Journal of Neuroscience*. 2011;31(4):1183-92.

Ciena AP, de Almeida SRY, Dias FJ, de Sousa Bolina C, Issa JPM, Iyomasa MM, Ogawa K, Watanabe I. Fine structure of myotendinous junction between the anterior belly of the digastric muscle and intermediate tendon in adults rats. *Micron*. 2011; 43(2–3): 258–262. Coggeshall RE, Zhou S, Carlton SM. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain research*. 1997;764(1):126-32.

Conte TC, Silva LH, Silva MT, Hirabara SM, Oliveira AC, Curi R, Moriscot AS, Aoki MS, Miyabara EH. The β 2-Adrenoceptor Agonist Formoterol Improves Structural and Functional Regenerative Capacity of Skeletal Muscles From Aged Rat at the Early Stages of Postinjury. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2012;67A(5):443–455.

Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. *European Journal of Biochemistry*. 2004;271(10):1814-9.

Daemen M, Kurvers H, Bullens P, Slaaf D, Freling G, Kitslaar P, van den Wildenberg F. Motor denervation induces altered muscle fibre type densities and atrophy in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience letters*. 1998;247(2-3):204-8.

Dario P, Garzella P, Toro M, Micera S, Alavi M, Meyer U, Valderrama E, Sebastiani L, Ghelarducci B, Mazzoni C, Pastacaldi P. Neural interfaces for regenerated nerve stimulation and recording. *IEEE Trans Rehabil Eng*. 1998;6(4):353-63.

De Medinaceli L, DeRenzo E, Wyatt RJ. Rat sciatic functional index data management system with digitized input. *Computers and biomedical research*. 1984;17(2):185-92.

De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Experimental neurology*. 1982;77(3):634-43.

Devor M, Seltzer Z. Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: Melzack PD, WaR, editor. *Textbook of Pain*. Churchill Livingstone; 1999;129-64.

Dwornik M, Bialoszewski D, Korabiewska I, Wronski Z. Principles of neuro mobilization for treating musculoskeletal disease. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2007;9(2):111-21.

Dwornik M, Kujawa J, Bialoszewski D, Slupik A, Kiebzak W. Electromyographic and clinical evaluation of the efficacy of neuromobilization in patients with low back pain. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2009;11(2):164-76.

Efstathiou MA, Stefanakis M, Savva C, Giakas G. Effectiveness of neural mobilization in patients with spinal radiculopathy: A critical review. *Journal of bodywork and movement therapies*. 2014;19(2):205-212.

Ellis RF, Hing WA. Neural mobilization: a systematic review of randomized controlled trials with an analysis of therapeutic efficacy. *J Man Manip Ther*. 2008;16(1):8-22.

Endres-Becker J, Heppenstall PA, Mousa SA, Labuz D, Oksche A, Schäfer M, Stein C, Zöllner C. μ -Opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Molecular pharmacology*. 2007;71(1):12-8.

Faweett J, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annual review of neuroscience*. 1990;13(1):43-60.

Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci*. 1991;14:219-45.

Galdino G, Duarte I, Perez A. Participation of endogenous opioids in the antinociception induced by resistance exercise in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2010;43(9):906-9.

Galer BS. Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. *Neurology*. 1995;45(12 Suppl 9):S17-25; discussion S35-6.

Gebhart G. Descending modulation of pain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2004;27(8):729-37.

Godoi J, Kerppers I, Rossi L, Corrêa F, Costa R, Corrêa J, Oliveira C. Electromyographic analysis of biceps brachii muscle following neural mobilization in patients with stroke. *Electromyography and clinical neurophysiology*. 2010; 50(1):55.

Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *European Journal of Neuroscience*. 1999;11(3):946-58.

Hökfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron*. 1991;7(6):867.

Hoot MR, Sim-Selley LJ, Selley DE, Scoggins KL, Dewey WL. Chronic neuropathic pain in mice reduces μ -opioid receptor-mediated G-protein activity in the thalamus. *Brain research*. 2011;1406:1-7.

Hwang S, Valtchanoff J. Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience letters*. 2003;349(1):41-4.

Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkuhler J. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science Signaling*. 2003;299(5610):1237.

Jang JH, Nam TS, Paik KS, Leem JW. Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. *Neuroscience letters*. 2004; 360(3):129-32.

Júnior OFH, Teixeira HA. Mobilização do sistema nervoso: Avaliação e tratamento. *Fisioterapia em movimento* 2007;20:41-53.

Kabli N, Cahill CM. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain*. 2007;127(1):84-93.

Kavлак Y, Uygur F. Effects of nerve mobilization exercise as an adjunct to the conservative treatment for patients with tarsal tunnel syndrome. *Journal of manipulative and physiological therapeutics*. 2011;34(7):441-8.

Konno K, Picolo G, Gutierrez VP, Brigatte P, Zambelli VO, Camargo A, Cury Y. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Peptides*. 2008;29(8):1293-304.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;15(227):680-5.

Lagraize S, Guo W, Yang K, Wei F, Ren K, Dubner R. Spinal cord mechanisms mediating behavioral hyperalgesia induced by neurokinin-1 tachykinin receptor activation in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*. 2010;171(4):1341-56.

Lee SE, Kim JH. Involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide in development and maintenance of neuropathic pain from spinal nerve injury model of rat. *Neuroscience research*. 2007;58(3):245-9.

Lew PC, Briggs CA. Relationship between the cervical component of the slump test and change in hamstring muscle tension. *Man Ther*. 1997;2(2):98-105.

Lopes RSD, Barja PR, Matos KBL, Delmondes FF, Lopes PFD, Silva KAS, Lima MO. Influência do alongamento muscular e da mobilização neural sobre a força do músculo quadríceps. 2010;9(4):603-609.

-
- Lowdon IMR, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de Medinaceli. *Journal of neuroscience methods*. 1988;24(3):279-81.
- Ma W, Bisby MA. Increase of preprotachykinin mRNA and substance P immunoreactivity in spared dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injury. *Eur J Neurosci*. 1998;10(7):2388-99.
- Ma W, Quirion R. Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. 2007;11(3):307-320.
- Mallmann JS, Moesch J, Tomé F, Vituri RF, de Carvalho AR, Bertolini GRF. Prevenção de hipotrofia muscular pelo uso da mobilização neural em modelo experimental de ciatalgia. 2012;11(1):13-16.
- Mansikka H, Sheth R, DeVries C, Lee H, Winchurch R, Raja S. Nerve injury - induced mechanical but not thermal hyperalgesia is attenuated in neurokinin - 1 receptor knockout mice. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2000;5(4):236-252.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology*. 1994;350(3):412-38.
- Marcioli MAR, Coradini JG, Kunz RI, Ribeiro LdFC, Brancalhão RMC, Bertolini GRF. Nociceptive and Histomorphometric Evaluation of Neural Mobilization in Experimental Injury of the Median Nerve. *The Scientific World Journal*. 2013; 2013:1-6.
- Maricar N, Shacklady C, McLoughlin L. Effect of Maitland mobilization and exercises for the treatment of shoulder adhesive capsulitis: a single-case design. *Physiother Theory Pract*. 2009;25(3) 203-17.
- Martins FD. Mobilização neural como recurso terapêutico na recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos após lesão traumática Florianópolis: Federal de Santa Catarina; 2009.
- Mayer DJ, Price DD. Central nervous system mechanisms of analgesia. *Pain*. 1976;2(4):379.
- Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science*. 1971;174(4016):1351.
- McArdle A, Dillmann WH, Mestrl R, Faulkner JA, Jackson MJ. Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J*. 2004;18(2):355-7.
- Miyabara EH, Conte TC, Silva MT, Baptista IL, Bueno Jr C, Fiamoncini J, Lambertucci RH, Serra CS, Brum PC, Pithon - curi T. Mammalian target of rapamycin complex 1 is involved in differentiation of regenerating myofibers in vivo. *Muscle & nerve*. 2010;42(5):778-87.
- Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H, Hiraga T, Ebisu S, Yoneda T. Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain. *Molecular biology of the cell*. 2010;21(15):2568-77.
- Oskay D, Meri AI, Kirdi N, Firat T, Ayhan, Leblebicioglu G. Neurodynamic mobilization in the conservative treatment of cubital tunnel syndrome: long-term follow-up of 7 cases. *Journal of manipulative and physiological therapeutics*. 2010;33(2):156-63.
- Pailleux F, Lemoine J, Beaudry F. Quantitative mass spectrometry analysis reveals that deletion of the TRPV1 receptor in mice alters substance P and neurokinin A expression in the central nervous system. *Neurochemical research*. 2012;37(12):2678-85.

-
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition Access Online via Elsevier; 2006.
- Payne B, Norfleet MA. Chronic pain and the family: a review. *Pain*. 1986;26:1-22.
- Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci*. 2004;74(12):1445-63.
- Pinto M, Sousa M, Lima D, Tavares I. Participation of mu-opioid, GABA (B), and NK1 receptors of major pain control medullary areas in pathways targeting the rat spinal cord: Implications for descending modulation of nociceptive transmission. *The Journal of comparative neurology*. 2008;510(2):175-87.
- Purves D, Dalmaz C. *Neurociências*. Artmed; 2005.
- Ramer MS, French GD, Bisby MA. Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain*. 1997;72(1):71-8.
- Reis F, Belchior A, Nicolau R, Fonseca T, Carvalho P. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (660Nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotome se seguida de anastomose epineural: análise funcional. *Rev Bras Fisioter*. 2008;12(3):215-21.
- Rotenstein L, Herath K, Gould RM, de Bellard ME. Characterization of the shark myelin Po protein. *Brain Behav Evol*. 2008;72(1):48-58.
- Ruscheweyh R, Smith WO, Drdla R, Liu X-G, Sandkuhler J. Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. *Mol Pain*. 2011;7(1):20.
- Russell N, Schaible HG, Schmidt R. Opiates inhibit the discharges of fine afferent units from inflamed knee joint of the cat. *Neuroscience letters*. 1987;76(1):107-12.
- Saban B, Deutscher D, Ziv T. Deep massage to posterior calf muscles in combination with neural mobilization exercises as a treatment for heel pain: A pilot randomized clinical trial. *Manual Therapy*. 2014;19(2):102-8.
- Sah DW, Ossipo MH, Porreca F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(6):460-72.
- Sánchez EM, Bagües A, Martín MI. Contributions of peripheral and central opioid receptors to antinociception in rat muscle pain models. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2010;96(4):488-95.
- Sandkühler J. CS03-01-Learning and memory in pain pathways. *European Psychiatry*. 2011;26:1774.
- Sandkühler J, Gruber-Schoffnegger D. Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): an update. *Current opinion in pharmacology*. 2012;12(1):18-27.
- Santos FM, Grecco LH, Pereira MG, Oliveira ME, Rocha PA, Silva JT, Martins DO, Miyabara EH, Chacur M. The neural mobilization technique modulates the expression of endogenous opioids in the periaqueductal gray and improves muscle strength and mobility in rats with neuropathic pain. *Behavioral and Brain Functions*. 2014;10(1):19.
- Santos FM, Silva JT, Giardini AC, Rocha PA, Achermann AP, Alves AS, Britto LR, Chacur M. Neural mobilization reverses behavioral and cellular changes that characterize neuropathic pain in rats. *Molecular pain*. 2012;8(1):57.
- Santos VR. A influência da mobilização neural do sistema nervoso na cáibra do escrivão. *Ter man*. 2004;4:166-71.
- Sapunar D, Kostic S, Banozic A, Puljak L. Dorsal root ganglion - a potential new therapeutic target for neuropathic pain. *J Pain Res*. 2012;5:31-8.

Savva C, Giakas G. The effect of cervical traction combined with neural mobilization on pain and disability in cervical radiculopathy. A case report. *Manual Therapy*. 2013;18(5):443-6.

Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2007. p. 28.

Schmid AB, Nee RJ, Coppieters MW. Reappraising entrapment neuropathies—mechanisms, diagnosis and management. *Manual Therapy*. 2013;18(6):449-57.

Silva JT, Santos FM, Giardini AC, Martins DO, Oliveira ME, Ciena AP, Gutierrez VP, Watanabe I, Britto LRG, Chacur M. Neural mobilization promotes nerve regeneration by nerve growth factor and myelin protein zero increased after sciatic nerve injury. *Growth Factors*. 2014:111-8.

Smaniotto ICG, Fontque MA. A influência da Mobilização do Sistema Nervoso na Amplitude de Movimento da Flexão do Quadril. *Terapia Manual*. 2004;2:154-7.

Smith MA, McClean JM, Bryant PA. Sensitivity to the effects of a kappa opioid in rats with free access to exercise wheels: differential effects across behavioral measures. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2004;77(1):49-57.

Sohn J-H, Lee BH, Park SH, Ryu J-W, Kim B-O, Park YG. Microinjection of opiates into the periaqueductal gray matter attenuates neuropathic pain symptoms in rats. *Neuroreport*. 2000;11(7):1413-6.

Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. New York; 1981. p. 859.

Staaf S, Franck M, Marmigère F, Mattsson JP, Ernfors P. Dynamic expression of the TRPM subgroup of ion channels in developing mouse sensory neurons. *Gene Expression Patterns*. 2010;10(1):65-74.

Stagg NJ, Mata HP, Ibrahim MM, Henriksen EJ, Porreca F, Vanderah TW, Malan Jr TP. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology*. 2011;114(4):940-8.

Stein C, Zöllner C. Opioids and sensory nerves. *Sensory Nerves*. 2009: 495-518.

Sweeney J, Harms A. Persistent mechanical allodynia following injury of the hand. Treatment through mobilization of the nervous system. *J Hand Ther*. 1996;9(4):328-38.

Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*. 1999;51(2):159-212.

Tegeder I, Meier S, Burian M, Schmidt H, Geisslinger G, Lötsch J. Peripheral opioid analgesia in experimental human pain models. *Brain*. 2003;126(5):1092.

Ueda H. Molecular mechanisms of neuropathic pain—phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;109(1):57-77.

van Sloten TT, Savelberg HH, Duimel-Peters IG, Meijer K, Henry R, Stehouwer CD, Schaper NC. Peripheral neuropathy, decreased muscle strength and obesity are strongly associated with walking in persons with type 2 diabetes without manifest mobility limitations. *Diabetes research and clinical practice*. 2011;91(1):32-9.

Vanti C, Generali A, Ferrari S, Nava T, Tosarelli D, Pillastrini P. [General postural rehabilitation in musculoskeletal diseases: scientific evidence and clinical indications]. *Reumatismo*. 2007;59(3):192-201.

Vilceanu D, Honore P, Hogan QH, Stucky CL. Spinal nerve ligation in mouse upregulates TRPV1 heat function in injured IB4-positive nociceptors. *The Journal of Pain*. 2010;11(6):588-99.

-
- Villafañe JH, Silva GB, Bishop MD, Fernandez-Carnero J. Radial nerve mobilization decreases pain sensitivity and improves motor performance in patients with thumb carpometacarpal osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2012;93(3):396-403.
- Wagner R, Heckman HM, Myers RR. Wallerian degeneration and hyperalgesia after peripheral nerve injury are glutathione-dependent. *Pain*. 1998;77(2):173-9.
- Wall PD, Melzack R. *Textbook of pain*. New York. 1999.
- Walsh MT. Upper limb neural tension testing and mobilization. Fact, fiction, and a practical approach. *J Hand Ther*. 2005;18(2):241-58.
- Wang J-Y, Huang J, Chang J-Y, Woodward DJ, Luo F. Morphine modulation of pain processing in medial and lateral pain pathways. *Mol Pain*. 2009;5(60):1-14.
- Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(8):949-65.
- Watanabe I, Yamada E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. *Arch Histol Jpn*. 1983;46:173-82.
- Waters AJ, Lumb BM. Descending control of spinal nociception from the periaqueductal grey distinguishes between neurons with and without C-fibre inputs. *Pain*. 2008;134(1):32-40.
- Wong LK, Luo Z, Kurusu N, Fujino K. Cervical spine simulation model for traction therapy analysis. *System Integration (SII)*, 2013 IEEE/SICE International Symposium on, 2013, p.516-20.
- Yaksh TL. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain research*. 1988;458(2):319-24.
- Yu H-S, Wu C-S, Yu C-L, Kao Y-H, Chiou M-H. Helium–neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. *Journal of investigative dermatology*. 2003;120(1):56-64.
- Zambelli VO, de Oliveira Fernandes AC, Gutierrez VP, Ferreira JCB, Parada CA, Mochly-Rosen D, Cury Y. Peripheral Sensitization Increases Opioid Receptor Expression and Activation by Crotalpine in Rats. *PLoS One*. 2014;9(3):e90576.
- Zamberlan LA, Kerppers II. Mobilização neural como um recurso fisioterapêutico na reabilitação de pacientes com acidente vascular encefálico. *Salus*. 2007;2:185-91.
- Zhang H, Cang C-L, Kawasaki Y, Liang L-L, Zhang Y-Q, Ji R-R, Zhao Z-Q. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKC ϵ : a novel pathway for heat hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience*. 2007;27(44):12067-77.
- Zhang N, Inan S, Cowan A, Sun R, Wang JM, Rogers TJ, Caterina M, Oppenheim JJ. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat-and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(12):4536.
- Zhou HY, Zhang HM, Chen SR, Pan HL. Increased C-fiber nociceptive input potentiates inhibitory glycinergic transmission in the spinal dorsal horn. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;324(3):1000.
- Zhou Y, Zhou ZS, Zhao ZQ. PKC regulates capsaicin-induced currents of dorsal root ganglion neurons in rats. *Neuropharmacology*. 2001;41(5):601-8.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.

Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 2001;429(1-3):23-37.

Zöllner C, Stein C. Opioids. In: analgesia.Springer; 2007. p.31-63.