Aline Carolina Giardini

**Efeitos da mobilização neural nas células gliais e no fator neurotrófico
derivado do cérebro para controle da dor neuropática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

Aline Carolina Giardini

Efeitos da mobilização neural nas células gliais e no fator neurotrófico derivado do cérebro para controle da dor neuropática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Giardini, Aline Carolina

Efeitos da mobilização neural nas células gliais e no fator
neurotrófico derivado do cérebro para controle da dor neuropática/
Aline Carolina Giardini-- São Paulo, 2013.

Orientador: Marucia Chacur.

Dissertação (Mestrado) – 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: Effects of neural mobilization in glial
cells and brain-derived neuropathic pain.

1. Dor 2. Fisioterapia 3. Modelos animais de doenças 4. Doenças do
sistema nervoso em animal I. Chacur, Profa. Dra. Marucia
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB035/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Carolina Giardini

Título da Dissertação: Efeitos da mobilização neural nas células gliais e no fator neurotrófico derivado do cérebro para controle da dor neuropática

Orientador(a): Profa. Dra. Marucia Chacur

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

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 **26** nas fls. **84** 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 no controle da dor neuropática induzida por constrição do nervo isquiático: participação do fator de crescimento neural (NGF) e da proteína O (PO)** do qual participou(aram) o(s) **Fabio Martinez dos Santos, Joyce Teixeira da Silva, Aline Carolina Giardini**, 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 **13.04.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 13 de abril de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

**Dedico este trabalho à minha família,
por ter me dado todo apoio necessário e
incentivo para sua realização.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Marucia Chacur, pelo apoio, incentivo, e até as broncas! “Maru, obrigada por tornar tudo isso possível, estar presente e sempre acessível para todos nós. Obrigada!”

Aos meus amigos do laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor, Prizoca, Mizinha, Mara (Patatá), Rê, Jojó, Dan e Fabio, amigos que serão para a vida inteira, que aguentaram meus momentos de insegurança, medo e me fizeram seguir em frente, se estou aqui é pelo apoio de vocês!! Obrigada por tudo! Amo muito vocês.

À Comissão de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais e ainda a todos os profissionais do departamento por terem dado suporte para a realização deste projeto, do início ao fim. À CAPES pelo auxílio financeiro para realização deste projeto.

À minha família, que sempre acreditou que eu era capaz, me apoiou, se orgulhou e sempre esteve comigo de todas as formas e em todos os momentos. Principalmente aos meus pais Márcia e Celso, meu irmão Rafael, meus avós e ao Roney. Amo muito vocês, sempre! Obrigado por existirem na minha vida!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, sozinha não seria possível.

**“Todo mundo é capaz de dominar a dor,
exceto quem a sente.”**

William Shakespeare

RESUMO

Giardini AC. Efeitos da mobilização neural nas células gliais e no fator neurotrófico derivado do cérebro para controle da dor neuropática. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A técnica de mobilização neural (NM) clinicamente é eficiente para a melhora da qualidade de vida de pacientes com dor neuropática, embora esta técnica apresente um grande sucesso clínico como terapia analgésica, ainda é pouco fundamentada. É de fundamental importância identificar quais fatores são liberados quando aplicada, propiciando assim, um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos durante sua aplicação. Assim, o presente trabalho submeteu ao tratamento com a técnica de NM os animais que tiveram a neuropatia induzida e posteriormente avaliou o envolvimento das células gliais e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) à nível espinal e supra espinal (tálamo e mesencéfalo) de ratos. Foram utilizados ratos adultos (180-220g) de linhagem *Wistar* submetidos à lesão constritiva crônica (CCI) do nervo isquiático, e após 14 dias iniciaram-se 10 sessões de NM, que foram realizadas em dias intercalados. Animais falso-operados (*sham*) submetidos à mesma incisão que os animais operados, porém sem ligação do nervo foram usados como controle. Os testes comportamentais de hiperalgesia térmica e mecânica e alodinia mecânica para avaliar o limiar nociceptivo dos animais foram aplicados sempre antes das sessões de NM. Após a décima e última sessão de NM, os animais (n=5) foram decapitados, a porção lombar da medula espinal, o tálamo e o mesencéfalo retirados e ensaios de *Western blotting* e imuno-histoquímica realizados para avaliação da expressão do BDNF, astrócitos e microglia nesses tecidos. Os animais com CCI mostraram diminuição no limiar nociceptivo, quando comparados com controle. Já os animais CCI tratados com NM apresentaram melhora efetiva no estudo comportamental quando comparados com animais que não receberam tratamento. A técnica de *Western blotting* mostrou que após CCI houve aumento de BDNF, OX-42 e de GFAP, na medula, no tálamo e no mesencéfalo, quando comparado com o grupo controle. Após o tratamento observamos diminuição de 56% e 82% de BDNF, 92% e 83% de OX-42 e 77% e 50% de GFAP em relação ao aumento gerado pela lesão constritiva na medula e no tálamo, respectivamente e no mesencéfalo redução de 151% de BDNF, 184% de OX-42 e 98% GFAP. Análise de imuno-histoquímica mostrou ter aumento da marcação para GFAP, OX-42 e BDNF nos núcleos ventral pósterolateral e centro medial do tálamo e na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo após a CCI. Baseado em nossos resultados sugerimos que a técnica de mobilização neural é eficaz na melhora do comportamento nociceptivo, e que há um possível envolvimento das células gliais e do BDNF, devido ao aumento observado após lesão e diminuição dos mesmos após o tratamento com a técnica de mobilização.

Palavras-chave: Mobilização neural. Dor neuropática. Nervo isquiático. Células gliais. BDNF.

ABSTRACT

Giardini AC. Effects of neural mobilization in glial cells and brain-derived neurotrophic factor to control neuropathic pain. [Masters thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The neural mobilization technique (NM) is clinically effective in improving the quality of life of patients with neuropathic pain, although this technique presents a major clinical success as analgesic therapy is still poorly reasoned. It is vital to identify which factors are released when the technique is applied, thereby providing a better understanding of the mechanisms involved in its implementation. Thus, our aims are submit neuronal NM technique to animals that had induced neuropathy and subsequently evaluate the involvement of glial cells and brain-derived neurotrophic factor on spinal level and in the thalamus and midbrain of rats. We used adult Wistar animals (180-220g) undergoing chronic constrictive injury (CCI) of the sciatic nerve, and after 14 days began 10 sessions of NM, which were performed every other day. Sham animals underwent the same incision that operated animals, but without nerve ligation, so were used as control. Behavioral tests of thermal and mechanical hyperalgesia and mechanical allodynia to assess animal nociceptive threshold were always applied before each mobilization sessions. After the tenth and last NM session, the animals (n = 5) were decapitated, the lumbar portion of the spinal cord, thalamus and midbrain were removed and Western blotting assays performed to assess the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), astrocytes and microglial cells in these tissues. CCI animals showed a decrease in the nociceptive threshold when compared to control animals. The CCI group treated with NM showed effective improvement in the behavioral study when compared with animals receiving no treatment. Western blotting assays showed that after the injury caused by CCI, BDNF, OX-42 and GFAP levels increased in spinal cord, thalamus and midbrain, as compared with the control group. Following treatment we observed a decrease of 56%, 82% and 151% of BDNF levels, 92%, 83% and 184% of OX-42 levels and 77%, 50% and 98% of GFAP levels compared to the increase generated by constrictive injury in the spinal cord and thalamus, respectively and in midbrain a decrease of 151% BDNF levels, 184% of OX-42 levels and 98% of GFAP levels. Immunohistochemical analysis showed an increased in GFAP, OX-42 and BDNF labeling in ventral posterolateral and centralmedian nuclei thalamic and midbrain periaqueductal gray after CCI. We suggest that NM technique is effective in improving nociceptive behavior, and there is a possible involvement of glial cells and BDNF due to the increase observed after injury and decrease thereof after treatment with the mobilization technique.

Keywords: Neural mobilization. Neuropathic pain. Sciatic nerve. Glial cells. BDNF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ilustração do modelo de lesão constritiva crônica do nervo isquiático..	23
Figura 2 -	Ilustração do teste de pressão da pata.....	24
Figura 3 -	Ilustração do teste de estimulação tátil – Filamentos de Von Frey.....	25
Figura 4 -	Ilustração do teste de Hargreaves ou plantar térmico.....	26
Figura 5 -	Ilustração da técnica de mobilização neural em ratos.....	27
Figura 6 -	Efeito da técnica de mobilização neural sob a resposta nociceptiva (estimulação mecânica) nos ratos com lesão no nervo isquiático.....	30
Figura 7 -	Efeito da técnica de mobilização neural sob a resposta nociceptiva (estimulação térmica) nos ratos com lesão no nervo isquiático.....	31
Figura 8 -	Efeito da técnica de mobilização neural sob a resposta nociceptiva (estimulação tátil) nos ratos com lesão no nervo isquiático.....	32
Figura 9 -	Efeito do anestésico inalatório e da tríplice flexão sob a resposta nociceptiva nos ratos com lesão no nervo isquiático.....	33
Figura 10 -	Ilustração de corte transversal de encéfalo de rato.....	34
Figura 11 -	Efeito da técnica de mobilização neural sobre os astrócitos.....	35
Figura 12 -	Fotomicrografias de cortes transversais do tálamo e mesencéfalo imunorreativos para detecção de GFAP.....	36
Figura 13 -	Efeito da técnica de mobilização neural sobre a micróglia.....	37
Figura 14 -	Fotomicrografias de cortes transversais do tálamo e mesencéfalo imunorreativos para detecção de OX-42.....	38
Figura 15 -	Efeito da técnica de mobilização neural sobre o fator neurotrófico derivado do cérebro.....	39
Figura 16 -	Fotomicrografias de cortes transversais do tálamo e mesencéfalo imunorreativos para detecção de BDNF.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1 Dor: considerações gerais	13
1.2 Dor neuropática	14
1.3 Mobilização neural	17
1.4 Objetivo geral	21
1.5 Objetivos específicos	21
2 MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1 Animais	22
2.2 Grupos experimentais	22
2.3 Procedimento cirúrgico para indução de dor neuropática	23
2.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa	23
2.4.1 <i>Teste de hiperalgesia mecânica</i>	24
2.4.2 <i>Alodinia mecânica</i>	24
2.4.3 <i>Teste de hiperalgesia térmica – Hargreaves test</i>	25
2.5 Procedimento terapêutico – mobilização neural	26
2.6 Ensaios de <i>Western blotting</i>	27
2.7 Ensaios de imuno-histoquímica	28
2.8 Análise estatística	29
3 RESULTADOS	30
3.1 Efeitos da mobilização neural sobre a nocicepção induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)	30
3.1.1 <i>Efeito na hiperalgesia mecânica</i>	30
3.1.2 <i>Efeito na hiperalgesia térmica</i>	31
3.1.3 <i>Efeito na alodinia tátil</i>	31
3.2 Efeito do anestésico inalatório e da tríplice flexão sobre a nocicepção induzida pela lesão constritiva crônica (CCI) do nervo isquiático.	32
3.3 Ensaios de <i>Western blotting</i> e imuno-histoquímica	34
3.3.1 <i>Efeito sobre os astrócitos</i>	34
3.3.2 <i>Efeito sobre a micróglia</i>	36
3.3.3 <i>Efeito sobre o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)</i>	38
4 DISCUSSÃO	41
5 CONCLUSÃO	47

REFERÊNCIAS 47

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Dor: considerações gerais

A dor, segundo Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) é definida com uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano” (IASP, 1986). Portanto, é um processo que envolve sensações e comportamento, cognição, sentimento e memória, sendo o sentimento um componente crítico para a experiência dolorosa (Biro, 2010).

Os neurônios responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva possuem, na periferia, terminações não mielinizadas (nociceptores) responsáveis pela detecção dos estímulos nocivos. As fibras nervosas nociceptivas estão envolvidas na transdução do estímulo nocivo periférico, na condução do potencial de ação para a medula espinal e na transmissão da informação nociceptiva para os neurônios centrais. Mecanismos distintos de transdução, receptores, canais iônicos e transmissores sensoriais medeiam estes processos (Grigg et al., 1986; Woolf, Costigan, 1999).

Durante o processo inflamatório, a dor pode ocorrer espontaneamente e/ou ainda por fenômenos de sensibilização, traduzidos pelo aumento da resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia), bem como pela presença de dor em resposta a estímulos não nocivos (alodinia) (Besson, 1999; Kidd, Urban, 2001). A sensibilização dos nociceptores pela ação de mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório, bem como o aumento da excitabilidade de neurônios do coluna posterior da medula espinal (sensibilização central), contribuem para estes estágios hipernociceptivos (Millan, 1999; Urban, Gebhart, 1999).

A dor transitória é usualmente observada quando neurônios sensoriais são ativados por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. As fibras nervosas responsáveis pela nocicepção são caracterizadas como fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, denominadas fibras C e A δ . As fibras C são fibras não mielinizadas, também chamadas fibras do grupo IV, com menor velocidade de condução (< 1 m/s) e respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química. As fibras A δ são fibras mielinizadas, também chamadas fibras do grupo III, com velocidade de condução de 5-30 m/s e respondem a estímulos térmicos e mecânicos (Julius, Basbaum, 2001). Estas fibras podem ser classificadas de acordo com sua resposta à estímulos nociceptivos e não-nociceptivos (Coggeshall et al., 1983).

A propagação da dor é iniciada pela geração de potenciais de ação nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, classificadas como fibras C e A δ , descritas anteriormente. Os neurônios aferentes primários, uma vez ativados, fazem conexões, diretas ou indiretas, com neurônios intrínsecos na coluna posterior da medula espinal que são classificados como: neurônios de projeção, que levam a informação nociceptiva para centros mais altos do cérebro, interneurônios excitatórios, que levam os impulsos sensoriais para os neurônios de projeção, ou interneurônios inibitórios, que regulam o fluxo de informação nociceptiva para as áreas mais altas (Jessell, Kelley, 1991). Os neurônios de projeção levam a informação nociceptiva, por diferentes vias ascendentes, para estruturas do tronco encefálico e diencefalo (Millan, 1999). Dentre as principais projeções supraespinais da via nociceptiva estão os tratos espinomesencefálico, espinoreticular, espino-hipotalâmico e espinotalâmico, sendo este último o mais proeminente na condução do impulso nocivo (Jessell, Kelley, 1991). A via espinotalâmica projeta-se para os núcleos talâmicos específicos, ventral pósterolateral (VPL) e ventral pósteromedial (VPM), envolvidos com os componentes discriminativos da sensibilidade dolorosa e para os núcleos talâmicos inespecíficos (centromedial, centrolateral, láterocentral e intralaminares), relacionados com os componentes afetivos da dor. No tálamo ocorre a recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo para o córtex cerebral, onde a informação pode ser somatotopicamente organizada (Craig, Rollman, 1999). Desta maneira a relevância dessas regiões corticais durante a percepção da resposta nociceptiva ainda permanece sem ser elucidada.

1.2 Dor neuropática

A lesão do nervo em humanos resulta, muitas vezes, em dor neuropática persistente ou crônica, caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia e hiperalgesia (Payne, Norfleet, 1986). A ocorrência de lesões no sistema nervoso periférico (SNP) e na medula espinal contribui para o desenvolvimento da dor neuropática. Esta dor pode ser atribuída à disfunção sensorial e alterações funcionais no sistema nervoso periférico ou central. Estudos evidenciaram que a dor crônica induzida por lesão no nervo isquiático pode ser atribuída por combinação de fatores como alteração anatômica, neuroquímica, inflamatória, expressão de canais iônicos do sistema nervoso central, dentre outros (Hains et al., 2003; Hains, Waxman, 2006). Lesões no nervo isquiático induzem não somente alterações periféricas, mas também corticais e subcorticais no sistema nervoso central (SNC). No entanto, algumas alterações ocorrem devido descontinuidade do transporte axonal

anterógrado/retrógrado no nervo terminal em ambos os sistemas, central e periférico. Estudos sugerem que a dor ocorre inicialmente por disfunção neural (Restuccia et al., 1992) e por alteração no sistema imune (Obata, Noguchi, 2006). Ainda, estudos demonstram o envolvimento das células da glia na dor induzida por lesão periférica (Watkins, Maier, 2003).

Nas últimas duas décadas, diversos estudos têm voltado sua atenção as células gliais, principalmente astrócitos e microglia, com o intuito de melhor esclarecer suas funções em modelo de dor experimental. Vários aspectos da contribuição nociceptiva da glia espinal foram reforçados, a um ponto em que elas agora aparecem como células de meta para o futuro (Milligan et al., 2002; Scholz, Woolf, 2007; Tsuda et al., 2005). Centralmente, a glia é formada pela macroglia (oligodentrócitos e astrócitos) e pela microglia (Haydon, 2001). Os astrócitos constituem cerca de 50% das células gliais (Kimelberg, 1983), contribuindo para a homeostasia e para a regulação de concentrações de íons K^+ . Evidências demonstram a existência de interação entre astrócitos e neurônios (Araque et al., 2001; Perea, Araque, 2002). Estas evidências estão baseadas em estudos empregando células em cultura e mostraram que neurotransmissores liberados por neurônios induzem, nos astrócitos, aumento dos níveis intracelulares de Ca^{++} , com consequente liberação de glutamato. O glutamato, uma vez liberado, modula a excitabilidade neuronal e o aumento da transmissão sináptica (Haydon, 2001). Os oligodentrócitos são responsáveis pela mielinização das fibras nervosas no SNC e podem ser considerados como equivalente às células de Schwann no sistema nervoso periférico. A microglia é caracterizada por células pequenas e ovais (Streit et al., 1988). Sendo o primeiro tipo de célula a responder a diversos tipos de lesões. A ativação microglial envolve um padrão de resposta celular estereotipado, com proliferação e recrutamento celular para o local da lesão, aumento da expressão de imunomoléculas e mudanças funcionais, incluindo a liberação de mediadores citotóxicos e/ou inflamatórios (Colburn, DeLeo, 1999).

As células gliais sintetizam várias substâncias, muitas das quais são também liberadas por neurônios nociceptivos que modulam a resposta nociceptiva, dentre as quais podemos citar as prostaglandinas, o glutamato, o ácido araquidônico, o óxido nítrico (NO) e as citocinas (Agullo et al., 1995; Hartung et al., 1988; Marriott et al., 1991; Stella et al., 1994). Concomitante, as mudanças de longa duração que ocorrem nestas células também incluem alterações estruturais, a proliferação celular, perda de neurotransmissor ou capacidades tampão-íon, liberação de mediadores pró-inflamatórios ou proalgesia e neurotoxicidade. Surpreendentemente, muitos modelos de dor investigados até agora resultaram em muitas mudanças fenotípicas da glia, principalmente na medula espinal (a

primeira retransmissão sináptica da via nociceptiva), mas também em estruturas cerebrais superiores (Hains, Waxman, 2006) e no sistema nervoso periférico (Ohtori et al., 2004; Rothermundt et al., 2007). Isto sugere que as funções alteradas das células gliais podem ser um mecanismo importante para a persistência de hipersensibilidade.

A importância das células da glia da medula espinal em processos nociceptivos foi primeiramente evidenciada por Garrison et al. (1991), que mostraram o aumento da densidade destas células, mais especificamente de astrócitos, na medula espinal, após a indução de ligaduras no nervo isquiático (Garrison et al., 1991). Ainda, a hiperalgesia térmica resultante da injeção subcutânea de formalina e intraperitoneal de endotoxina (Watkins, Maier, 1999) é bloqueada pela injeção intratecal de inibidores gliais. Da mesma forma, a alodinia mecânica resultante da injeção periférica de zimosan, é também bloqueada por inibidor metabólico das células da glia (Milligan et al., 2000). A lesão no nervo acarreta, na medula espinal, a liberação, pelas células da glia, de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β e o TNF α , as quais medeiam os processos nociceptivos decorrentes desta lesão (Benveniste, 1992; Luber-Narod et al., 1994).

Quanto aos fatores neurotróficos, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), foi a segunda molécula descoberta da família das neurotrofinas, em 1982 (Barde et al., 1982), sendo o primeiro a ser descoberto o fator de crescimento neural (NGF) e posteriormente a neurotrofina – 3 (NT-3) e a neurotrofina – 4/5 (NT-4/5) (Barde et al., 1982; Fernandes, 2009; Purves, 2010).

O BDNF é originado, assim como as outras neurotrofinas, em tecidos-avos (Purves, 2010), é transportado anterogradamente a partir dos corpos celulares para os terminais da medula espinal (Pezet et al., McMahon, 2002), para manter a sobrevivência neural. Além dos núcleos neuronais ele também é produzido por células gliais, sendo considerado a principal neurotrofina do cérebro (Fernandes, 2009). Pode ser encontrado no hipocampo, neocórtex, cerebelo (Fernandes, 2009), gânglio da raiz posterior e medula espinal (Pezet et al., 2002).

As neurotrofinas desempenham um importante papel sobre o crescimento, sobrevivência e diferenciação de um subgrupo de neurônios; modulação do crescimento dendrítico; formação e manutenção de conexões em quantidade apropriada ou eliminação (Gheno, 2008; Kandravicius, 2010; Purves, 2010), ou seja, crescimento, sobrevivência e manutenção dos neurônios (Gheno, 2008). Sendo assim, esses processos são sensíveis a sinalização trófica (Purves, 2010).

Esta sinalização se dá na ligação com duas classes de receptores: receptores específicos tirosina-cinase (TrK), onde o BDNF e a NT4/5 ligam-se ao TrKB e aos receptores

p75, membro da família dos fatores de necrose tumoral (TNF), onde todas as neurotrofinas ligam-se a este receptor (Fernandes, 2009; Gheno, 2008; Purves, 2010; Santos, 2007).

O BDNF é expresso por uma subpopulação de neurônios sensoriais de pequeno e médio diâmetro. Estes neurônios expressam SP, que é co-liberada com BDNF na medula espinal, modulando a transmissão nociceptiva mediada pelo glutamato (Rodrigues Filho, 2003; Sah et al., 2003). Segundo Sah et al. (2003) existem relatos de que a inibição do BDNF endógeno ou de seu receptor TrKB é capaz de reduzir a dor experimental na maioria dos estudos. Ainda, a administração exógena de BDNF induz hiperalgesia térmica e alodinia mecânica e a injeção intratecal de anticorpo anti-BDNF foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica (Sah et al., 2003).

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 et al., 2003), e também por tratar-se de uma experiência multidimensional que integra funcionalmente estruturas do sistema límbico e cortical, para iniciar a percepção da dor e as respostas a esta lesão (Hunt e Mantyh, 2001).

As opções terapêuticas para o controle da dor neuropática têm aumentado (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, anticonvulsivantes, administração sistêmica de anestésicos locais, agentes tópicos, analgésicos narcóticos e não narcóticos, anti-rítmicos (Galer, 1995; Sah et al., 2003) e tratamento não medicamentoso como, fisioterapia. Um dos procedimentos utilizados por fisioterapeutas no combate a dor neuropática é a técnica de mobilização neural.

1.3 Mobilização neural

A técnica de mobilização neural (NM) 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, 2003). Atualmente, a técnica vem sendo utilizada como método de avaliação e terapêutica para as 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; Dwornik et al., 2009; Júnior, Teixeira, 2007; Sweeney, Harms, 1996).

Devido a essa integração, quando certos movimentos combinados são executados, os nervos são levados a grande tensão, que é transmitida em direção as raízes nervosas e consequentemente, ao neuroeixo (Smaniotto, Fonteque, 2004). A integração pode ser mais bem compreendida com a descrição do clássico teste de mobilização neural de elevação da perna estendida (SLR - Straight Leg Raise) onde, certamente, os movimentos articulares tencionam os axônios que compõem o nervo isquiático.

Lew, et al (1997) concluiu que os movimentos de flexão cervical e flexão do quadril influenciam diretamente na medula espinal devido a conexão existente com o aparelho locomotor e com isso os autores sugerem que esses movimentos devem ser combinados em determinados tipos de terapia (Lew, Briggs, 1997).

Os primeiros achados clínicos sobre mobilização neural surgiram em meados de 1979 com o trabalho de Breig. O autor descobriu que o aparelho locomotor tinha um impacto forte sobre o sistema nervoso, ou seja, todo movimento para ser realizado com uma amplitude de movimento normal, dependia de uma boa elasticidade do tecido neural, especificamente dos nervos. Por se tratar de um tecido conjuntivo, o sistema nervoso de certa forma protege os componentes neurais de modo a assegurar que os impulsos sejam transmitidos ao mesmo tempo em que o ser humano assume as mais diversas posturas com amplitudes demasiadamente excessivas (Bessa, 2004; Breig, Troup, 1979). Durante a execução dos movimentos corporais o tecido conjuntivo protege os axônios das forças de tensão e compressão incidentes sobre os nervos (Bessa, 2004). A relação sadia, longe de lesões, entre nervos e aparelho locomotor em relação as suas interfaces teciduais permitirá aos indivíduos mover-se de forma livre e sem dor (Zamberlan, Kerppers, 2007).

Diversos estudos consideram o tecido nervoso central e periférico como contínuo, não existindo outros tecidos com tamanha conectividade no corpo humano, e por este motivo, qualquer comprometimento na interface mecânica entre tecido nervoso e tecidos adjacentes comprometerá a neurodinâmica (movimento, elasticidade, condução, fluxo axoplasmático) podendo comprometer o próprio tecido nervoso ou o aparelho locomotor, devido, à já descrita integração existente entre esses dois sistemas, ou seja, estresses impostos no sistema nervoso periférico durante os movimentos são transmitidos para o sistema nervoso central. De forma oposta, tensão gerada no sistema nervoso central pode ser transmitida para o sistema nervoso periférico (Marinzeck, 2009; Salgado, 2004).

O sistema nervoso sempre realiza uma de suas funções que é a propagação de impulsos elétricos chamados de potenciais de ação. No entanto, essa propagação depende de uma neurodinâmica normal (Smaniotto, Fonteque, 2004). Os nervos frequentemente são comprometidos por lesões. As lesões como, por exemplo, compressão nervosa causa alteração mecânica (diminuição da elasticidade do nervo) das fibras nervosas ocasionando diminuição do fluxo sanguíneo levando a uma isquemia e consequentemente lesão local (Marinzeck, 2009).

A técnica de mobilização neural restabelece às funções normais do tecido nervoso comprometido pela lesão. A pesquisa realizada por Dwornik et al. (2007) destaca que a mobilização neural 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 mobilização neural deverá ser aplicado, 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 causará melhora na dor e em todos os tecidos adjacente como, por exemplo, o aparelho locomotor. Desta forma a técnica melhora a qualidade de vida dos pacientes com os mais diversos tipos de lesões, 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, restaurar a função neuromecânica normal e restaurar a função fisiológica normal das células do tecido nervoso (Butler, 2003; Santos, 2004).

Ellis et al. (2008) destaca a escassez em quantidade e qualidade das pesquisas disponíveis sobre mobilização neural. O estudo também revela que há poucas evidências terapêuticas sobre a técnica de mobilização neural e ressalta a importância de novas pesquisas para comprovar a eficácia terapêutica desta técnica. Os autores concluíram que a técnica de mobilização neural possui estudos clínicos limitados e sugerem novas pesquisas e uma reavaliação sobre os efeitos desta técnica (Ellis, Hing, 2008).

Sweeney e Harms em 1996, concluíram que a mobilização neural diminui a alodinia mecânica e aumenta a amplitude de movimento no membro comprometido em humanos. Os autores sugerem que a mobilização neural é uma ferramenta útil na avaliação e no tratamento dos indivíduos com alodinia mecânica (Sweeney, Harms, 1996).

Para Walsh (2005), estudos clínicos e ciências básicas tem suportado o uso da técnica de mobilização neural, porém o autor destaca a falta de rigor dos estudos clínicos randomizados.

O autor menciona também que a mobilização neural parece ser uma técnica efetiva, mas como ela funciona ainda não é bem conhecido, porém se usada de forma inadequada pode causar múltiplos problemas clínicos. Ainda, sugere, que não há estudos sobre dosagem apropriada como, por exemplo, duração, frequência e amplitude de movimento. Para o autor, a técnica de mobilização neural é guiada pelo princípio de educação do terapeuta, exercícios e encorajamento do paciente (Walsh, 2005).

Estudos buscam embasar cientificamente a técnica de mobilização neural. Em 2009, Dwornik et al, avaliaram a evidência clínica da técnica de mobilização neural em 108 pacientes. Para isso os autores utilizaram um eletromiógrafo de superfície e a escala analógica de dor, além de fisioterapia convencional. Todos os pacientes apresentavam dor na região da coluna lombar com sintomas em membros inferiores. Os pacientes foram divididos em dois grupos: controle e mobilização neural. Todos receberam tratamento por duas semanas. Os autores concluíram que os pacientes tratados com mobilização neural apresentaram uma diminuição significativa do tônus muscular de repouso em vários músculos do membro inferior. O grupo controle, o qual recebeu fisioterapia convencional apresentou diminuição significativa somente do tônus muscular de repouso para o músculo gastrocnêmio. Ambos os grupos demonstraram diminuição da dor (Dwornik et al., 2009).

No entanto a técnica de mobilização neural melhora a qualidade de vida dos pacientes com os mais diversos tipos de lesões (Butler, 2003; Santos, 2004), mas ainda carece de mais pesquisas básica ou clínica com melhor qualidade metodológica, randomização dos grupos, tempo de tratamento, amplitude de movimento e frequência de tratamento (Ellis, Hing, 2008; Walsh, 2005).

Recentemente estudos realizados por Martins et al. (2011), mostraram em animais experimentais, que a mobilização articular foi eficaz em melhorar os efeitos nociceptivos induzido pela lesão no nervo isquiático (Martins et al., 2011). Ainda, Sluka et al (2006), demonstraram que a mesma mobilização articular foi possível reverter os efeitos maléficos na lesão nervosa ou inflamatória induzida pela injeção de capsaicina em animais experimentais (Sluka et al., 2006; Sluka, Wright, 2001).

Somando a estes dados, recentemente nosso grupo mostrou que o tratamento com mobilização neural gerou aumento da densidade óptica para o NGF e proteína zero no nervo isquiático, favorecendo a regeneração do nervo isquiático, e uma diminuição do NGF e GFAP após tratamento com NM no gânglio da raiz posterior (DRG) ambos após indução da dor neuropática por lesão constritiva crônica do nervo isquiático (Santos et al., 2012).

Conforme descrito na literatura, existem poucos dados descrevendo os mecanismos envolvidos durante a aplicação da técnica de mobilização neural. Assim, o melhor entendimento desses mecanismos durante a aplicação da técnica pode contribuir para diversas terapias clínicas relacionadas ao tratamento de pacientes comprometidos com dor neuropática decorrente de lesões como, por exemplo, hérnias de disco, pinçamento nervoso entre outras.

Acreditamos que por meio da pesquisa básica, padronizando e utilizando a técnica de mobilização neural em animais e utilizando ferramentas de pesquisa e quantificação avançadas, como *Western Blotting*. Poderemos ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos na melhora da sintomatologia dolorosa, e transportando os conhecimentos adquiridos pela análise deste estudo experimental para a rotina clínica poderemos contribuir para a qualidade de vida dos pacientes acometidos pelos mais diversos quadros de dor neuropática.

1.4 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a participação das células da glia (astrócitos e microglia), e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em ratos com dor neuropática induzida pela lesão constritiva crônica do nervo isquiático após aplicação da técnica de mobilização neural.

1.5 Objetivos específicos

a) Avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais antes e após da indução da neuropatia periférica, e após o tratamento de mobilização neural, utilizando modelo de alodinia mecânica, hiperalgesia mecânica e térmica;

b) Determinação da expressão de células da glia e do fator neurotrófico derivado do cérebro na medula, no tálamo e no mesencéfalo, dos diferentes grupos experimentais, por meio da técnica de *Western Blotting*;

c) Determinação da localização destes mediadores no tálamo e no mesencéfalo, dos animais com dor neuropática, por meio de ensaios de imuno-histoquímica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, pesando entre 180-220g. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas- ICB/ USP e mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia, do mesmo Instituto. Todos os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada, 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 da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do ICB (número 26, fls 84 livro 02). Para a realização dos experimentos, os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção (Zimmermann, 1983).

2.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em grupos experimentais. Os grupos que receberam tratamento com a técnica de mobilização neural, iniciaram as sessões no 14º dia após lesão (período que se estabelece a neuropatia, já bem descrito na literatura); o grupo *naive* não passou por nenhum procedimento, utilizado como controle absoluto. Sendo $n=5$ para os testes comportamentais e os mesmos para a técnica de *western blotting*.

- Grupo 1: ratos controle – *naive*.
- Grupo 2: ratos controle – falso operado (*sham*), subdivididos em:
 - Grupo 2a: ratos falso operados sem mobilização neural (*sham*).
 - Grupo 2b: ratos falso operados com mobilização neural (*sham* NM).
- Grupo 3: ratos com dor neuropática (CCI), subdivididos em:
 - Grupo 3a: ratos operados com mobilização neural (CCI NM).
 - Grupo 3b: ratos operados sem mobilização neural (CCI).
 - Grupo 3c: ratos operados sem mobilização neural e anestesiados (CCI Halotano)
 - Grupo 3d: ratos operados sem mobilização neural e com tríplice flexão (CCI Tríplice flexão)

Os animais foram sacrificados após o término do tempo equivalente a dez sessões de mobilização neural. Somente os grupos *naive* e CCI foram submetidos as análises de imuno-histoquímica (N=3).

2.3 Procedimento cirúrgico para indução de dor neuropática

Para a indução de dor neuropática, foi realizada cirurgia de lesão constritiva crônica (CCI) no nervo isquiático, de acordo com o método descrito por Bennett e Xie (1988). Os animais foram anestesiados e em seguida o nervo isquiático foi exposto na região mediana da coxa, afastando-se o músculo bíceps femoral. A 7 mm de distância da trifurcação do nervo isquiático, foram realizadas 4 ligaduras frouxas ao redor deste com categut cromado (4-0), distantes entre si em aproximadamente 1mm (Figura 1). 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. O grupo controle é composto por animais falso-operados (*sham*), submetidos à mesma incisão que os animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem a ligadura do nervo (Bennett, Xie, 1988).

Figura 1 – Ilustração do modelo de lesão constritiva crônica do nervo isquiático

Fonte: Modificado de Bennett e Xie (1988).

2.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa

Em todos os testes comportamentais, descritos a seguir, os ratos foram inicialmente adaptados ao ambiente do teste por trinta minutos, durante dois dias que antecederam o primeiro experimento, e nos dias dos ensaios, por 10 minutos antes do início dos mesmos. Todos os testes foram realizados em “duplo cego” e, antes de cada sessão de mobilização neural, ou seja, demonstrando o efeito da sessão anterior, e descartando a interferência do anestésico nos resultados.

Os testes foram aplicados antes do procedimento cirúrgico (para obtenção da medida inicial), após 14 dias da lesão (para avaliar se o procedimento cirúrgico de lesão constritiva crônica induziu o quadro neuropático) e ao longo do tratamento com mobilização neural (com a finalidade de avaliar se este tratamento é ou não eficaz na melhora da resposta nociceptiva).

2.4.1 Teste de hiperalgesia mecânica

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e Sellito (1957). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso da pata posterior direita do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de "retirada" do membro (Figura 2). Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação (Randall, Sellitto, 1957). Os resultados foram avaliados por meio de comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 2 – Ilustração do teste de pressão da pata

Fonte: Laboratório de neuroanatomia funcional da dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

2.4.2 Alodinia mecânica

A determinação da alodinia mecânica foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo de pressão aplicado à pata posterior do rato, segundo o método descrito por Chaplan et al. (1994), adaptado. Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em caixas de acrílico com base aberta e tampa que contém pequenas aberturas. A caixa de

acrílico fica sobre uma grade, que mede 1 metro de comprimento por 45 cm de largura, com espaço entre os arames de 1 cm. A grade fica fixada na parede, para permitir acesso às patas destes animais (Figura 3). Para o ensaio de alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de Von Frey (Aesthesiometer Semmes-Weinstein, Stoelting Co., EUA). Os filamentos e seus valores respectivos em gramas são: 3.61 (0.407 g); 3.84 (0.692 g); 4.08 (1.202 g); 4.17 (1.479 g); 4.31 (2.041 g); 4.56 (3.630 g); 4.74 (5.495 g); 4.93 (8.511 g); 5.07 (11.749 g) e 5.18 (15.136 g). O filamento capaz de induzir a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para induzir a resposta (100% de resposta) (Chaplan et al., 1994).

Os resultados foram avaliados por meio de comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 3 – Ilustração do teste de estimulação tátil – Filamentos de Von Frey

Fonte: Laboratório de neuroanatomia funcional da dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

2.4.3 Teste de hiperalgesia térmica – Hargreaves test

A determinação da hiperalgesia térmica foi feita por meio do teste plantar térmico descrito por Hargreaves et al. (1988). O teste consiste em aquecimento por meio de fonte de luz infravermelha aplicada na região plantar da pata do animal. Para realização do teste o animal é colocado em compartimento de acrílico, sobre uma plataforma de vidro própria, que permite a passagem de forma homogênea da luz e do calor. A fonte de luz infravermelha está acoplada a um monitor digital, que é posicionada e acionada sob a região plantar da pata experimental do animal (Figura 4). Quando acionada pelo pesquisador, um cronômetro digital é deflagrado no monitor, e um feixe de luz de incidência constante é emitido sob a região plantar da pata até que apresente o comportamento de retirada da mesma (Hargreaves et al., 1988). Caso o animal não apresente o comportamento de retirada da pata em 30 segundos,

automaticamente a fonte de luz é cortada para a preservação da integridade do tecido, evitando lesões. Os resultados foram avaliados por meio de comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 4 – Ilustração do Teste de Hargreaves ou plantar térmico

Fonte: Santos (2010)¹.

2.5 Procedimento terapêutico – mobilização neural

Para tratar os ratos que foram submetidos ao modelo de dor neuropática, foi utilizada a técnica de mobilização neural descrita inicialmente para humanos (Butler, 1991) e padronizada pelo nosso grupo de pesquisa em ratos (Santos et al., 2012). Para a realização da técnica os ratos foram anestesiados com Halotano (anestésico inalatório – Cristália, São Paulo, BRA) com fluxo contínuo de oxigênio durante todo o procedimento. Após a anestesia, iniciou-se o tratamento dos animais, momento em que, o rato foi posicionado em decúbito lateral. Em seguida, a articulação do joelho foi posicionada em extensão, permanecendo assim durante todo o tratamento. Além disso, a articulação do quadril foi flexionada até o momento em que foi percebida uma resistência mínima da musculatura da região posterior de coxa e perna (Figura 5A). A partir desse momento, foi realizada a dorsi-flexão da articulação do tornozelo (figura 5B), sendo manipulada em dorsi-flexão aproximadamente 20 oscilações por minuto, durante 2 minutos, com pausa de 25 segundos para descanso (Figura 5C). O tratamento ocorreu por dez minutos, sendo que no último minuto foi incluída ao tratamento a flexão cervical, com a finalidade de tensionar o neuroeixo. Desta forma, foi tensionado ainda mais o trajeto do nervo comprometido (Figura 5D). Os animais foram submetidos a este tratamento no 14º dia após a lesão em dias intercalados, ou seja, dia sim dia não, somando um total de 10 sessões de mobilização neural.

Foram adicionados dois grupos controle, um grupo para descartar a possibilidade de o anestésico inalatório estar interferindo em nossos resultados, sendo animais com CCI sem

¹ Fotografias retiradas por F. M. Santos. São Paulo, 2010.

tratamento que foram submetidos à inalação do anestésico (halotano) por 10 minutos, o mesmo tempo utilizado para os grupos com tratamento, em dias intercalados durante 10 sessões. Para controle da técnica foi adicionado um grupo, com lesão neuropática, submetido a tríplice flexão do membro inferior (flexão de quadril, joelho e tornozelo) retornando após a flexão a posição neutra, realizando aproximadamente dez repetições por minuto, pelo mesmo período, para descartar a possibilidade de que somente a manipulação poderia gerar alterações comportamentais.

Figura 5 – Ilustração da técnica de mobilização neural em ratos

Estabilização do quadril e extensão do joelho (A), dorsiflexão do tornozelo (B), oscilações do tornozelo (C) e flexão cervical (D).

Fonte: Santos (2010)².

2.6 Ensaios de *Western blotting*

Cabe mencionar que inicialmente, os animais foram utilizados nos testes comportamentais e após seu término, os mesmos foram decaptados, a medula, o tálamo e o

² Fotografias retiradas por F. M. Santos. São Paulo, 2010.

mesencéfalo foram retirados. Foi utilizado somente o material do lado experimental de cada animal.

O conteúdo protéico do material isolado da medula, do tálamo e do mesencéfalo dos animais foi dosado pelo método de Bradford (Amresco, USA) (Bradford, 1976). Após a quantificação de proteína total pelo método de Bradford, as amostras foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE. Os materiais foram diluídos em um mesmo volume de tampão Tris/HCl 125mM, 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 5 min. As amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 10% e submetido a eletroforese com corrente contínua de 120 V. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2 um de diâmetro)(Towbin et al., 1979). Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Após bloqueio com leite desnatado Molico (Nestlé, Araçatuba, S.P., BRA) 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,5), por 1 hora, as membranas foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos: I) para GFAP (1:1000, Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, Clone G-A-5 – Sigma, St. Louis, MO, USA); II) para OX-42 (1:1000, Purified mouse anti-rat Cd11b/c monoclonal antibody – BD Bioscience Pharmigen, USA) e para BDNF (AB1779SP, 1:1000, Chemicon International, Temacula, CA); Os anticorpos foram diluídos em solução bloqueadora, por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase (goat anti rabbit HRP IgG (1:10.000; Chemicon), diluído a 1:5000 em solução bloqueadora. O excesso foi removido com mais de um ciclo de lavagens com Tris-Salina. A β -actina foi utilizada como controle interno da reação (monoclonal mouse anti- β -actina [1:10000] - Sigma, St. Louis, MO, USA). As membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL (Amersham Biosciences, NJ, USA) de quimiluminescência e foram analisadas quanto à densidade óptica das bandas marcadas, utilizando o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). A análise dos dados foi feita pela média das diferenças percentuais entre os diferentes grupos experimentais.

2.7 Ensaios de imuno-histoquímica

Após tratamento, animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina (300 ml), seguida de solução fixadora (500 ml) constituída de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, o

tecido (encéfalo) foi coletado e armazenado em paraformaldeído 4%, durante 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução contendo sacarose a 30% em PB para crioproteção. Após 24 horas, os tecidos foram cortados em uma espessura de 30µm em um micrótomo deslizante de congelamento ou em um criostato.

Os cortes foram submetidos à metodologia imuno-histoquímica para detecção de anticorpos específicos para células da glia, GFAP (1:1000, Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, Clone G-A-5 – Sigma St. Louis, MO, USA); OX-42 (1:1000, Purified mouse anti-rat Cd11b/c monoclonal antibody – BD Bioscience Pharmingen, USA) e para o fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF (AB1779SP, 1:1000, Chemicon International, Temacula, CA). A imunorreatividade foi analisada ao microscópio de luz. Cabe mencionar que esta técnica foi utilizada para localizar a distribuição dos diferentes mediadores nas áreas supra-espinais e a quantificação foi feita pelos ensaios de *Western blotting*.

2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) associada ao teste de Tukey, para comparação de mais de duas médias. O índice de significância considerado foi de $P < 0.05$ (Sokal, Rohlf, 1981).

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos da mobilização neural sobre a nocicepção induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

3.1.1 Efeito na hiperalgesia mecânica

Os animais que foram submetidos à constrição do nervo isquiático (CCI), apresentaram aumento da sensibilidade à dor, ou seja diminuição do limiar nociceptivo, quando comparados à medida inicial. Os animais tratados com a técnica de mobilização neural (CCI NM) mostraram reversão do quadro de hiperalgesia mecânica a partir da 2ª sessão (figura 6), aumentando o limiar nociceptivo. Nota-se que o grupo falso-operado com mobilização neural (*sham* NM) e *naive* apresentam valores semelhantes à medida inicial, demonstrando que somente a incisão e exposição do nervo não modificaram o limiar de dor.

Figura 6- Efeito da técnica de mobilização neural na resposta nociceptiva (estimulação mecânica) nos ratos com lesão no nervo isquiático.

O limiar de dor, determinado pelo teste de Randall e Selitto e expresso em gramas, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14 dias (14d) após lesão e após sessões de mobilização neural. Os resultados apresentam a média de $\pm$ epm de 5 animais por grupo. *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo CCI. # $p < 0,05$ em comparação a medida inicial.

3.1.2 Efeito na hiperalgesia térmica

Os animais que foram submetidos à constrição no nervo isquiático (CCI), apresentaram diminuição do limiar térmico quando comparado à medida inicial e aos grupos controles (*naive* e *sham* NM), como podemos observar na figura 7. Nota-se também, o aumento do limiar nociceptivo térmico dos animais tratados com mobilização neural (CCI NM) a partir da 4ª sessão, que representa o tratamento da 3ª sessão de mobilização neural. Os animais controles não apresentaram diferença em relação à medida inicial.

Figura 7- Efeito da técnica de mobilização neural sob a resposta nociceptiva (estimulação térmica) nos ratos com lesão no nervo isquiático.

O limiar térmico, avaliado pelo teste de Hargreaves, expresso em segundos, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14 dias (14d) após lesão e após sessões de mobilização neural. Os resultados apresentam a média de $\pm$ epm de 5 animais por grupo. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo CCI. # $p < 0,05$ em comparação a medida inicial.

3.1.3 Efeito na alodinia tátil

Após a lesão constritiva crônica (CCI) do nervo isquiático houve diminuição do limiar de alodinia, quando comparado à medida inicial e aos falso-operados com mobilização neural (*sham* NM) (figura 8). A intensidade do estímulo (em gramas) obedece a uma série logarítmica de filamentos, descrita por Von Frey. Foi observada reversão parcial do limiar nociceptivo dos animais tratados com mobilização neural a partir da 2ª sessão e uma reversão

total a partir da 4^o sessão de mobilização neural. Animais falso-operados não apresentaram diferença em relação à medida inicial.

Figura 8- Efeito da técnica de mobilização neural sob a resposta nociceptiva (estimulação tátil) nos ratos com lesão no nervo isquiático.

O limiar de alodinia, avaliado pelo teste de Von Frey, expresso em gramas, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14 dias (14d) após lesão e após sessões de mobilização neural. Os resultados apresentam a média de $\pm$ epm de 5 animais por grupo. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo CCI. # $p < 0,05$ em comparação a medida inicial.

3.2 Efeito do anestésico inalatório e da tríplice flexão sobre a nocicepção induzida pela lesão constritiva crônica (CCI) do nervo isquiático.

A constrição do nervo isquiático (CCI) acarretou diminuição do limiar térmico (Figura 9A), mecânico (Figura 9B) e alodínico (Figura 9C), quando comparado à medida inicial. Nota-se que os grupos CCI Halotano e com tríplice flexão (CCI TF) apresentam valores semelhantes ao CCI, ou seja, o halotano inalatório ou o movimento de tríplice flexão somente não interferem com a resposta comportamental.

Figura 9- Efeito do anestésico inalatório e da tríplice flexão sob a resposta nociceptiva nos ratos com lesão no nervo isquiático.

O limiar mecânico (A), térmico (B) e alodínico (C) foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14 dias (14d) após lesão e antes das sessões com anestésico e com tríplice flexão. Os resultados apresentam a média de $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o CCI, CCI Halotano e CCI TF.

3.3 Ensaios de *Western blotting* e imuno-histoquímica

Como uma forma de melhor embasar os resultados de comportamento, anteriormente expostos, foram realizados ensaios de *western blotting*, demonstrando o envolvimento das células gliais (astrócitos – GFAP e microglia – OX-42) e BDNF no tálamo (lado experimental - contralateral a lesão) e na medula (lado experimental – homolateral a lesão) em modelo de dor neuropática e sua modulação após tratamento com a técnica de mobilização neural. Para melhor visualização dos resultados, os valores foram transformados em porcentagem, considerando a média do grupo *naive* como 100%.

Ensaios de imuno-histoquímica foram realizados para determinar a localização da marcação dessas células gliais e do BDNF após a lesão constritiva crônica nos núcleos ventral pósterolateral (VPL) e centromedial (CM) (Figura 10A) e na substância cinzenta periaquedutal (PAG) (Figura 10B).

Figura 10 – Ilustração de corte transversal de encéfalo de rato.

Fonte: Paxinos (2005).

3.3.1 Efeito sobre os astrócitos

A medula, o tálamo e o mesencéfalo dos animais experimentais e controles foram analisados e podemos observar aumento estatístico da densidade óptica das bandas marcadas com GFAP de 140% na medula (Figura 11A), 130% no tálamo (Figura 11B) e 65% no mesencéfalo (Figura 11C), do grupo com lesão constritiva crônica (CCI) comparada com o grupo *naive*. Após o tratamento com mobilização (CCI NM), foi observada uma diminuição de 77% na medula, 50% no tálamo e 98% no mesencéfalo quando comparado com o grupo

operado e sem mobilização neural (CCI). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas para GFAP. Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados (Figura 11). Com a técnica de imunohistoquímica podemos observar aumento para a marcação de GFAP nos núcleos ventral pósterolateral e centromedial do tálamo e na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo (Figura 12).

Figura 11- Efeito da técnica de mobilização neural sobre os astrócitos.

Na medula (A), no tálamo (B) e no mesencéfalo (C). Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo *naive*.

Figura 12- Fotomicrografias de cortes transversais do tálamo e mesencéfalo imunorreativos para detecção de GFAP.

Marcação da reatividade para GFAP nos grupos *naive* (controle) e CCI (lesão constritiva crônica) no tálamo e no mesencéfalo. VPL - núcleo ventral pósterio lateral; CM – núcleo centromedial; PAG – substância cinzenta periaquedutal. Escala 100 µm, objetiva 10x.

3.3.2 Efeito sobre a microglia

Podemos observar aumento estatístico da densidade óptica das bandas marcadas com OX-42 na medula (80%), no tálamo (60%) e no mesencéfalo (25%) do grupo com lesão constritiva crônica (CCI) comparada com o grupo controle (*naive*). Após o tratamento com mobilização (CCI NM), foi observado quando comparado com o grupo operado e sem mobilização neural (CCI) diminuição na expressão de micróglia (medula- 92%, tálamo – 83% e mesencéfalo – 184%) (Figura 13 A, B e C respectivamente). Os resultados estão

representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas para OX-42. Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Observamos maior marcação para OX-42 nos núcleos ventral pósterolateral e no centromedial do tálamo e na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo nos animais com lesão constritiva crônica, quando comparado com o grupo sem lesão (*naive*), através da técnica de imuno-histoquímica (Figura 14).

Figura 13- Efeito da técnica de mobilização neural sobre a microglia.

Na medula (A), no tálamo (B) e no mesencéfalo (C). Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo *naive*.

Figura 14- Fotomicrografias de cortes transversais do tálamo e mesencéfalo imunorreativos para detecção de OX-42.

Marcação da reatividade para OX-42 nos grupos *naive* (controle) e CCI (lesão constritiva crônica) no tálamo e no mesencéfalo. VPL - núcleo ventral póster lateral; CM – núcleo centromedial; PAG – substância cinzenta periaquedutal. Escala 100 μ m, objetiva 10x.

3.3.3 Efeito sobre o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

Analizados a medula, o tálamo e mesencéfalo dos animais experimentais e controles, podemos observar no grupo com lesão constritiva crônica (CCI) quando comparado com o grupo controle um aumento estatístico da densidade óptica das bandas marcadas com BDNF na medula (148%), no tálamo (45%) e no mesencéfalo (27%). Após o tratamento com mobilização (CCI NM), foi observado uma diminuição do BDNF de 56% na medula, 82% no tálamo e 151% no mesencéfalo quando comparado com o grupo operado e sem mobilização

neural (CCI) (Figura 15). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas para BDNF. Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Nossos resultados de imuno-histoquímica demonstram maior imunorreatividade para BDNF nos núcleos ventral pósterolateral e centromedial do tálamo e na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo no grupo CCI quando comparados ao grupo controle *naive* (Figura 16).

Figura 15- Efeito da técnica de mobilização neural sobre o fator neurotrófico derivado do cérebro.

Na medula (A), no tálamo (B) e no mesencéfalo (C). Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo *naive*.

Figura 16- Fotomicrografias de cortes transversais do tálamo e mesencéfalo imunorreativos para detecção de BDNF.

Marcação da reatividade para BDNF nos grupos *naive* (controle) e CCI (lesão constritiva crônica) no tálamo e no mesencéfalo. VPL - núcleo ventral pósterolateral; CM – núcleo centromedial; PAG – substância cinzenta periaquedutal. Escala 100 μ m, objetiva 10x.

4 DISCUSSÃO

A sensibilização dos nociceptores manifesta-se com uma diminuição do limiar nociceptivo de ativação após um dano tecidual e intensidade aumentada da reação a um dano prejudicial. Em muitas condições patológicas, a lesão tecidual representa a causa imediata da dor. Esta lesão resulta na liberação local de diversos mediadores químicos que irão agir sobre as terminações nervosas, ativando-as diretamente, ou exacerbando sua sensibilidade para outras formas de estimulação como, por exemplo, hiperalgesia e alodinia (Dray, 1995, 1997).

A lesão constritiva crônica (CCI) do nervo isquiático, utilizada como modelo experimental, em ratos, induz comportamento doloroso de hiperalgesia e alodinia semelhante ao observado em humano, portanto, este modelo, é aceito como modelo que se assemelha à dor neuropática humana (Bennett, Xie, 1988; Kim et al., 1997; Mosconi, Kruger, 1996). O modelo de CCI mostrou-se eficiente sendo que após o 14º dia observamos, por meio de testes comportamentais, a instalação do quadro de dor neuropática, demonstrada por uma diminuição do limiar nociceptivo dos animais quando comparadas às medidas iniciais (MI), demonstrando assim o bom funcionamento do modelo experimental. Reforçando os dados apresentados por Bennett & Xie (1988) que descreveram inicialmente este modelo e, ainda, corroborando a trabalhos que demonstram que a lesão do nervo resulta em dor neuropática persistente ou crônica, caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia e hiperalgesia (Chacur et al., 2010; Coutaux et al., 2005; Payne, Norfleet, 1986).

As opções terapêuticas para o controle da dor neuropática têm aumentado (Galer, 1995), entretanto a resposta dos pacientes acometidos por esse tipo de dor para muitos dos tratamentos não é satisfatória. Clinicamente, a aplicação da técnica de mobilização neural, tem demonstrado excelentes resultados em pacientes com neuropatia (Dwornik et al., 2007; Dwornik et al., 2009; Júnior, Teixeira, 2007; Sweeney, Harms, 1996). Em nosso estudo, a padronização da técnica de mobilização neural em ratos com CCI demonstrou ser efetiva em relação à avaliação da sensibilidade dolorosa, uma vez que, os animais operados e tratados com mobilização neural (CCI NM) apresentaram nos testes de pressão da pata, plantar térmico e alodinia, valores estatísticos maiores, quando comparados aos animais sem tratamento (CCI), revertendo significativamente o efeito hiperalgésico e/ou alodínico induzido pela lesão.

Um aspecto a ser levado em consideração para a diferença observada no tempo de resposta entre os testes comportamentais é o fato de diferentes tipos de fibras estarem envolvidas na percepção do estímulo, como por exemplo, as fibras A δ do tipo 2 apresentarem

alto limiar mecânico, porém em resposta a uma lesão tem a diminuição do limiar para esses estímulos, e ainda as fibras do tipo C tem uma população de nociceptores que normalmente respondem somente a estímulos térmicos, em decorrência da lesão passam a responder também a estímulos mecânicos (Julius, Basbaum, 2001), tendo aumento da resposta hiperalgésica mecânica. Com a melhora no processo inflamatório e início da regeneração com a técnica de mobilização neural, essas fibras deixam de responder a estímulos mecânicos, voltando a condições normais, podendo ser essa a razão da melhora rápida da hiperalgesia mecânica, tendo a reversão antes da térmica.

Ao avaliar a possível interferência do anestésico inalatório em nossos resultados, não foi possível observar diferença nos testes comportamentais quando comparamos o grupo CCI Halotano com o CCI, corroborando, portanto, aos dados de outro autor que ressalta que o anestésico halotano não interfere nas respostas comportamentais, desde que os testes sejam realizados após 24 horas da sedação (Goto et al., 1994). Outros estudos demonstram também que o anestésico inalatório halotano foi capaz de retornar a níveis basais de resposta nociceptiva mais rapidamente do que outros anestésicos inalatórios como, enflurano, isoflurano e desflurano, mostrando, portanto que este anestésico não influencia no modelo de sensibilização crônica (Goto et al., 1994; Martins et al., 2011; O'Connor, Abram, 1995) e em nossos resultados.

Interações glial-neuronal foram estudadas no contexto de nocicepção reforçada e estudos de vários grupos têm demonstrado que a microglia e astrócitos na medula espinal são essenciais para a iniciação e manutenção da dor patológica (Hains, Waxman, 2006; Hashizume et al., 2000; Ledebor et al., 2005; Milligan et al., 2003; Raghavendra et al., 2003; Sun et al., 2008; Sun et al., 2006).

Além das alterações gliais que ocorrem na medula espinal e nos nervos, modificações também são observadas em várias regiões do cérebro. Estas incluem a ativação da microglia talâmica pós-lesão da medula espinal nociceptiva (Hains, Waxman, 2006; Zhao et al., 2007), ativação astrocitária no córtex cingulado após ligadura do nervo isquiático (Kuzumaki et al., 2007; Narita et al., 2006), e no núcleo do trato solitário após inflamação do cólon (Sun et al., 2005). Ainda, a ativação glial observada em regiões não diretamente envolvidas na nocicepção, mas sim no circuito límbico (como o córtex pré-frontal) sugere que a glia pode estar envolvido na regulação do componente afetivo da dor (Rajkowska, Miguel-Hidalgo, 2007).

No presente modelo experimental, optamos por estudar o envolvimento da microglia por meio do marcador OX-42 e do astrócito com um marcador específico, a proteína glial

fibrilar ácida (GFAP), pois ambos são descritos relacionados com estados de dor exacerbada decorrentes de diferentes manipulações como, por exemplo, a inflamação subcutânea, neuropatia e ativação imune espinal (Hashizume et al., 2000; Ledebor et al., 2005; Raghavendra et al., 2003; Raghavendra et al., 2004; Sweitzer et al., 2001; Tsuda et al., 2003; Watkins, Maier, 2002; Watkins et al., 2001), tal como ocorre em nosso modelo.

Em nossos resultados de imuno-histoquímica, ao analisarmos os cortes do encéfalo, observamos menor marcação para GFAP e OX-42 no grupo *naive*, enquanto, no grupo CCI, observamos aumento da imunorreatividade no núcleo ventral pósterolateral e centromedial do tálamo e na substância cinzenta periaquedutal (PAG) do mesencéfalo, nestes núcleos estão localizados os corpos celulares dos neurônios de terceira e quarta ordem das vias nociceptivas, trato espino-talâmico anterior e espino-reticular. Os resultados de *western blotting* demonstraram um aumento de GFAP e de OX-42 no tálamo, na medula e no mesencéfalo de ratos com constrição do nervo isquiático, quando comparados com os grupos controles (Naive e sham). Em contrapartida, no grupo operado e tratado com a mobilização neural foi possível observar reversão deste quadro, observado pela diminuição da expressão de GFAP (medula 77%, tálamo 50% e mesencéfalo 98%) e OX-42 (medula 92%, tálamo 83% e mesencéfalo 184%), sugerindo assim, o envolvimento das células gliais em nosso modelo. Assim, nossos resultados estão de acordo com o encontrado na literatura corrente sobre o tema e com os primeiros achados de Garrison e colaboradores (1991), onde examinaram a expressão de GFAP e demonstraram que a dor induzida por meio da constrição do nervo isquiático também ativava astrócitos e a administração de N-metil-D-aspartato (NMDA) antagonista MK801, um fármaco usado para bloquear a dor também bloqueou a ativação astrocitária.

Sweitzer e colaboradores (2001) também relataram que a imunorreatividade (IR) dos níveis de GFAP e o OX-42, marcador específico para astrócitos e microglia, respectivamente, foram elevados sob o estado de dor neuropática causada por transecção do nervo L5 espinal em ratos (Sweitzer et al., 2001). Confirmamos os achados de Raghavendra et al. (2003) que mostraram que a inibição da ativação da microglia por administração de minociclina, atenuou o desenvolvimento do comportamento de hipersensibilidade, em um modelo de dor neuropática por transecção do nervo (Raghavendra et al., 2003).

Sabe-se que após lesão do nervo o metabolismo neuronal é modificado, de modo que, aumenta a síntese de proteínas para auxiliar a regeneração, papel desempenhado pelas neurotrofinas, como fator de crescimento neural (NGF) e fator neurotrófico derivado do

cérebro (BDNF), que regulam a crescimento e sobrevivência dos neurônios sensoriais (Lewin, Barde, 1996; Merighi et al., 2004).

Recentemente, tem havido fortes evidências de que neurotrofinas, em especial o BDNF, desempenham um papel fundamental como mediador / modulador da dor (Matayoshi et al., 2005; Pezet, McMahon, 2006; Trang et al., 2012). Sugere-se que a síntese de BDNF é aumentada não apenas em neurônios aferentes primários durante o processo doloroso, mas também em neurônios nociceptivos de segunda ordem (Onda et al., 2004; Pezet, McMahon, 2006) e células gliais da coluna posterior (Coull et al., 2005; Tokumine et al., 2003).

Portanto optamos por avaliar o BDNF no presente modelo experimental, porque apesar das recentes descobertas sobre o papel das neurotrofinas durante o estado de dor crônica sabe-se pouco sobre o papel do BDNF em relação à dor neuropática. Vários estudos mostram a expressão de BDNF alterada na medula espinal e DRG, porém se há alterações a nível supra espinal ainda é desconhecido. Isso destaca a importância de estudar o envolvimento desta neurotrofina na geração e manutenção da dor neuropática em áreas supra espinais (Ha et al., 2001; Miletic, Miletic, 2002; Obata et al., 2003), tal como fizemos neste estudo.

A sinalização entre os neurônios e a microglia é essencial na transmissão da dor neuropática, uma parte dessa sinalização foi elucidada com a descoberta que a ativação da microglia (através da sinalização do receptor P2X4), provoca a liberação de BDNF que altera a excitabilidade dos neurônios da coluna posterior da medula que se dirigem para o córtex (Coull et al., 2005), a hiperexcitabilidade desses neurônios é capaz de gerar e manter a dor neuropática após a lesão do nervo.

Em nossos resultados de imuno-histoquímica, em cortes do encéfalo, observamos maior imunorreatividade para BDNF nos núcleos centromedial e póstero lateral do tálamo e na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo no grupo CCI, quando comparado com o grupo *naive*. Os resultados de *western blotting* mostram diferença estatística da densidade óptica das bandas marcadas para BDNF (aumento de 45% no tálamo, 148% na medula e 27% no mesencéfalo) do grupo com CCI quando comparado com o grupo controle. Com o tratamento de mobilização (CCI NM), observamos a diminuição em relação ao aumento evidenciado no grupo CCI (redução de 82% no tálamo, 56% na medula e 151% no mesencéfalo). Assim, podemos sugerir o envolvimento do BDNF no modelo de dor neuropática e sua modulação com o tratamento. Em parte, esses resultados corroboram a outros estudos que demonstram o envolvimento do BDNF na geração de dor crônica, pois o bloqueio entre o BDNF e o seu receptor TrKB é capaz de reverter a alodinia (Coull et al.,

2005) e a síntese desta neurotrofina foi aumentada em diferentes populações neuronais nos DRG's em modelos animais de dor neuropática e inflamatória (Obata et al., 2004; Vanelderen et al, 2010).

Estudos realizados por Ha et al. (2001), também encontraram maior expressão de BDNF em pequenos, médios e grandes neurônios no DRG L4 e L5 e em fibras axonais na lâmina medial superficial e profunda da coluna posterior L4 / L5 ipsilateral local onde estes neurônios se projetam (Ha et al., 2001), o que corrobora a nossos resultados.

Em síntese o tratamento com a técnica de mobilização neural foi capaz de reverter, a partir da segunda sessão, a hiperalgesia e a alodinia mecânica induzida pela lesão no nervo isquiático. Porém a hiperalgesia térmica só foi revertida a partir da 4ª sessão de mobilização. O aumento observado na densidade óptica para os astrócitos, micróglia e BDNF no mesencéfalo, no tálamo e na medula, essa última em maior intensidade, foi revertida com o tratamento de mobilização. Portanto acreditamos que a mobilização neural diminui os sintomas da dor neuropática (hiperalgesia e alodinia), pois diminui o BDNF, GFAP e Ox-42 na medula, no tálamo e no mesencéfalo. Porém novos estudos ainda se fazem necessários para compreender de forma mais ampla esse processo.

5 CONCLUSÃO

Observamos que houve um aumento da densidade óptica das bandas marcadas para as células gliais e BDNF nos ensaios de *Western Blotting*, demonstrando uma maior ativação destes mediadores durante o modelo de dor neuropática, que foram revertidos com a técnica de mobilização neural, sugerindo o envolvimento desses mediadores nesse processo. Baseado também em nos nossos resultados a técnica de mobilização neural se mostrou eficiente no tratamento da dor neuropática gerada pela lesão constritiva crônica do nervo isquiático, pois reverteu o quadro de hiperalgesia térmica e mecânica e alodinia.

REFERÊNCIAS*

- Agullo L, Baltrons MA, Garcia A. Calcium-dependent nitric oxide formation in glial cells. *Brain Res.* 1995;686(2):160-8.
- 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.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:795-813.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1(5):549-53.
- 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.
- Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol.* 1992;263(1 Pt 1):C1-16.
- Bessa IM. Testes neurodinâmicos do membro superior. *EssFisiOnline São Paulo.* 2004;20-30.
- Besson JM. The neurobiology of pain. *Lancet.* 1999;353(9164):1610-5.
- Biro D. Is there such a thing as psychological pain? And why it matters. *Cult Med Psychiatry.* 2010;34(4):658-67.
- 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.
- Breig A, Troup JD. Biomechanical considerations in the straight-leg-raising test. Cadaveric and clinical studies of the effects of medial hip rotation. *Spine (Phila Pa 1976).* 1979;4(3):242-50.
- Butler DS. Mobilization of the nervous system. Singapore: Churchill Livingstone; 1991.
- Butler DS. Mobilização do sistema nervoso. São Paulo: Manole; 2003.
- Chacur M, Matos RJB, Alves AS, Rodrigues AC, Gutierrez VP, Cury Y, Britto L. Participation of neuronal nitric oxide synthase in experimental neuropathic pain induced by sciatic nerve transection. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(4):367-76.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods.* 1994;53:55-63.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references.[updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- Coggeshall RE, Hong KA, Langford LA, Schaible HG, Schmidt RF. Discharge characteristics of fine medial articular afferents at rest and during passive movements of inflamed knee joints. *Brain Res.* 1983;272(1):185-8.
- Colburn RW, DeLeo JA. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Brain Res Bull.* 1999;49(6):419-27.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature.* 2005;438(7070):1017-21.
- Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine.* 2005;72(5):359-71.
- Craig JC, Rollman GB. Somesthesia. *Annu Rev Psychol.* 1999;50:305-31.
- Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth.* 1995;75:125-31.
- Dray A. The pharmacology of pain. *Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin: Springer; 1997. p. 21-41.
- 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.
- 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.
- Fernandes BS. Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no transtorno bipolar: uma metanálise Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
- Galer BS. Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. *Neurology.* 1995;45(12 Suppl 9):S17-25; discussion S35-6.
- Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.* 1991;565(1):1-7.
- Gheno TC. Associação do polimorfismo Val66Met no BDNF com a idade de início da doença de Huntington. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- Goto T, Marota JJ, Crosby G. Nitrous oxide induces preemptive analgesia in the rat that is antagonized by halothane. *Anesthesiology.* 1994;80(2):409-16.
- Grigg P, Schaible HG, Schmidt RF. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. *J Neurophysiol.* 1986;55(4):635-43.

- Ha SO, Kim JK, Hong HS, Kim DS, Cho HJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2001;107(2):301-9.
- Hains BC, Klein JP, Saab CY, Craner MJ, Black JA, Waxman SG. Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2003;23(26):8881-92.
- Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2006;26(16):4308-17.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988;32:77-88.
- Hartung HP, Heininger K, Schafer B, Toyka KV. Substance P and astrocytes: stimulation of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *Faseb J*. 1988;2(1):48-51.
- Hashizume H, DeLeo JA, Colburn RW, Weinstein JN. Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(10):1206-17.
- Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(3):185-93.
- Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(2):83-91.
- Jessell TM, Kelley KW. Pain and analgesia. In: Kandell ERS, Schwartz J.H.; Jessel, TM, editor. *Principles of Neural Science*; 1991. p. 385-99.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10.
- Júnior OFH, Teixeira HÁ. Mobilização do sistema nervoso: avaliação e tratamento. *Fisioterapia em Movimento, São Paulo*. 2007;20(3):41-53.
- Kandratavicius Lea. Neurotrofinas na epilepsia do lobo temporal. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*. 2010;16.
- Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*. 2001;87(1):3-11.
- Kim KJ, Yoon YW, Chung JM. Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res*. 1997;113(2):200-6.
- Kimelberg HK. Primary astrocyte cultures--a key to astrocyte function. *Cell Mol Neurobiol*. 1983;3(1):1-16.
- Kuzumaki N, Narita M, Hareyama N, Niikura K, Nagumo Y, Nozaki H, Amano T, Suzuki T. Chronic pain-induced astrocyte activation in the cingulate cortex with no change in neural or glial differentiation from neural stem cells in mice. *Neurosci Lett*. 2007;415(1):22-7.

- Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain*. 2005;115(1-2):71-83.
- 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.
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*. 1996;19:289-317.
- Luber-Narod J, Kage R, Leeman SE. Substance P enhances the secretion of tumor necrosis factor-alpha from neuroglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1994;152(2):819-24.
- Marinzeck S. Mobilização neural - aspectos gerais. [online]. 2009. [cited 2012 Agosto 5]. Disponível em: http://www.terapiamaneiro.com.br/site/noticias/arquivos/200912101725220.artigo_7.pdf.
- Marriott DR, Wilkin GP, Wood JN. Substance P-induced release of prostaglandins from astrocytes: regional specialisation and correlation with phosphoinositol metabolism. *J Neurochem*. 1991;56(1):259-65.
- Martins DF, Mazzardo-Martins L, Gadotti VM, Nascimento FP, Lima DA, Speckhann B, Favretto GA, Bobinski F, Cargnin-Ferreira E, Bressan E, Dutra RC, Calixto JB, Santos AR. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. *Pain*. 2011;152(11):2653-61.
- Matayoshi S, Jiang N, Katafuchi T, Koga K, Furue H, Yasaka T, Nakatsuka T, Zhou XF, Kawasaki Y, Tanaka N, Yoshimura M. Actions of brain-derived neurotrophic factor on spinal nociceptive transmission during inflammation in the rat. *J Physiol*. 2005;569(Pt 2):685-95.
- Merighi A, Carmignoto G, Gobbo S, Lossi L, Salio C, Vergnano AM, Zonta M. Neurotrophins in spinal cord nociceptive pathways. *Prog Brain Res*. 2004;146:291-321.
- Miletic G, Miletic V. Increases in the concentration of brain derived neurotrophic factor in the lumbar spinal dorsal horn are associated with pain behavior following chronic constriction injury in rats. *Neurosci Lett*. 2002;319(3):137-40.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999;57(1):1-164.
- Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res*. 2000;861(1):105-16.
- Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(3):1026-40.

- Milligan ED, Verge G, Twining C, Chapman G, Maier SF, Naeve G, Watkins LR. The potential role of fractalkine, a neural chemokine, in creating spinally mediated exaggerated pain states. *J Pain Suppl.* 2002;2:30.
- Mosconi T, Kruger L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain.* 1996;64(1):37-57.
- Narita M, Kuzumaki N, Kaneko C, Hareyama N, Miyatake M, Shindo K, Miyoshi K, Nakajima M, Nagumo Y, Sato F, Wachi H, Seyama Y, Suzuki T. Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical delta-opioid receptor dysfunction. *J Neurochem.* 2006;97(5):1369-78.
- O'Connor TC, Abram SE. Inhibition of nociception-induced spinal sensitization by anesthetic agents. *Anesthesiology.* 1995;82(1):259-66.
- Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res.* 2006;55(1):1-10.
- Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A, Yoshikawa H, Noguchi K. Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. *Exp Neurol.* 2004;188(1):149-60.
- Obata K, Yamanaka H, Fukuoka T, Yi D, Tokunaga A, Hashimoto N, Yoshikawa H, Noguchi K. Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain.* 2003;101(1-2):65-77.
- Ohtori S, Takahashi K, Moriya H, Myers RR. TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine.* 2004;29(10):1082-8.
- Onda A, Murata Y, Rydevik B, Larsson K, Kikuchi S, Olmarker K. Infliximab attenuates immunoreactivity of brain-derived neurotrophic factor in a rat model of herniated nucleus pulposus. *Spine (Phila Pa 1976).* 2004;29(17):1857-61.
- Payne B, Norfleet MA. Chronic pain and the family: a review. *Pain.* 1986;26:1-22.
- Perea G, Araque A. Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *J Physiol Paris.* 2002;96(3-4):199-207.
- Pezet S, Malcangio M, McMahon SB. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain Res Brain Res Rev.* 2002;40(1-3):240-9.
- Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:507-38.
- Purves Dea. Neurociências. Porto Alegre; 2010.

- Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(2):624-30.
- Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA. Attenuation of morphine tolerance, withdrawal-induced hyperalgesia, and associated spinal inflammatory immune responses by propentofylline in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(2):327-34.
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007;6(3):219-33.
- Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. *Arch. Inst. Pharmacodyn*. 1957;111:209-19.
- Restuccia D, Di Lazzaro V, Lo Monaco M, Evoli A, Valeriani M, Tonali P. Somatosensory evoked potentials in the diagnosis of cervical spondylotic myelopathy. *Electromyogr Clin Neurophysiol*. 1992;32(7-8):389-95.
- Rodrigues Filho R. Estudo farmacológico de um novo modelo de dor neuropática: avulsão do tronco inferior do plexo braquial de rato. Universidade Federal de Santa Catarina; 2003.
- Rothermundt M, Ohrmann P, Abel S, Siegmund A, Pedersen A, Ponath G, Suslow T, Peters M, Kaestner F, Heindel W, Arolt V, Pfleiderer B. Glial cell activation in a subgroup of patients with schizophrenia indicated by increased S100B serum concentrations and elevated myo-inositol. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(2):361-4.
- Sah DW, Ossipo MH, Porreca F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(6):460-72.
- Salgado ASI. Apostila de pós-graduação. Escola de terapia manual e postura. São Paulo: Guanabara Koogan; 2004.
- Santos FM, Silva JT, Giardini AC, Rocha PA, Achermann APP, Alves AS, Britto LRG, Chacur M. Neural mobilization reverses behavioral and cellular changes that characterize neuropathic pain in rats. *Molecular Pain*. 2012;8:57.
- Santos NB. Estudo da regeneração axonal em enxerto nervoso (n. suaral) autólogo a partir de nervo craniano intacto (n. vago). Bauru: Universidade de São Paulo; 2007.
- Santos VR. A influência da mobilização neural do sistema nervoso na câibra do escrivão. *Terapia Manual*. 2004;2(8):166-71.
- Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*. 2007;10(11):1361-8.
- Sluka KA, Skyba DA, Radhakrishnan R, Leeper BJ, Wright A. Joint mobilization reduces hyperalgesia associated with chronic muscle and joint inflammation in rats. *J Pain*. 2006;7(8):602-7.

- Sluka KA, Wright A. Knee joint mobilization reduces secondary mechanical hyperalgesia induced by capsaicin injection into the ankle joint. *Eur J Pain*. 2001;5(1):81-7.
- Smaniotto ICG, Fontequ MA. A influência da mobilização do sistema nervoso na amplitude de movimento da flexão do quadril. *Terapia Manual*. 2004;2(3):154-157
- Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. New York; 1981. p. 859.
- Stella N, Tence M, Glowinski J, Premont J. Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes. *J Neurosci*. 1994;14(2):568-75.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*. 1988;1(5):301-7.
- Sun S, Cao H, Han M, Li TT, Zhao ZQ, Zhang YQ. Evidence for suppression of electroacupuncture on spinal glial activation and behavioral hypersensitivity in a rat model of monoarthritis. *Brain Res Bull*. 2008;75(1):83-93.
- Sun S, Chen WL, Wang PF, Zhao ZQ, Zhang YQ. Disruption of glial function enhances electroacupuncture analgesia in arthritic rats. *Exp Neurol*. 2006;198(2):294-302.
- Sun YN, Luo JY, Rao ZR, Lan L, Duan L. GFAP and Fos immunoreactivity in lumbo-sacral spinal cord and medulla oblongata after chronic colonic inflammation in rats. *World J Gastroenterol*. 2005;11(31):4827-32.
- 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.
- Sweitzer S, Martin D, DeLeo JA. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2001;103(2):529-39.
- Sweitzer SM, Schubert P, DeLeo JA. Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antiallodynic properties in a rat model of neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;297(3):1210-7.
- Tokumine J, Kakinohana O, Cizkova D, Smith DW, Marsala M. Changes in spinal GDNF, BDNF, and NT-3 expression after transient spinal cord ischemia in the rat. *J Neurosci Res*. 2003;74(4):552-61.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.
- Trang T, Beggs S, Salter MW. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol*. 2012;1-10.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci*. 2005;28(2):101-7.

- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003;424(6950):778-83.
- Urban MO, Gebhart GF. Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):7687-92.
- Vanelderen P, Rouwette T, Kozicz T, Roubos E, Van Zundert J, Heylen R, Vissers K. The role of brain-derived neurotrophic factor in different animal models of neuropathic pain. *Eur J Pain*. 2010;14(5):473 e1-9.
- Walsh MT. Upper limb neural tension testing and mobilization. Fact, fiction, and a practical approach. *J Hand Ther*. 2005;18(2):241-58.
- Watkins LR, Maier SF. Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):7710-3.
- Watkins LR, Maier SF. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev*. 2002;82(4):981-1011.
- Watkins LR, Maier SF. GLIA: A novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(12):973-85.
- Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci*. 2001;24(8):450-5.
- Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1999; 96(14):7723-30.
- Zamberlan LA, Kerppers II. Mobilização neural como um recurso fisioterapêutico na reabilitação de pacientes com acidente vascular encefálico. *Salus*. 2007;2:185-91.
- Zhao P, Waxman SG, Hains BC. Extracellular signal-regulated kinase-regulated microglia-neuron signaling by prostaglandin E2 contributes to pain after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2007;27(9):2357-68.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.