Fabio Martinez dos Santos

**Mobilização neural em rato *Wistar* reverte comportamento e
mudanças celulares que caracterizam a dor neuropática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências.

**São Paulo
2012**

Fabio Martinez dos Santos

**Mobilização neural em rato *Wistar* reverte comportamento e
mudanças celulares que caracterizam a dor neuropática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia 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 corrigida: A versão original encontra-se arquivada no setor de comunicação do ICB

**São Paulo
2012**

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

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Fabio Martinez dos.

Mobilização neural em rato *Wistar* reverte comportamento e mudanças celulares que caracterizam a dor neuropática / Fabio Martinez dos Santos. -- São Paulo, 2011.

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: Neural mobilization reverses behavioral and cellular changes that characterize neuropathic pain in rats Wistar

Descritores: 1. Hiperalgesia 2. Dor crônica 3. Nervo isquiático 4. Proteína zero 5. Fator de crescimento Neural 6. Gânglio da raiz posterior I. Chacur, Marucia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0195/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fabio Martinez dos Santos.

Título da Dissertação: Mobilização neural em rato *Wistar* reverte comportamento e mudanças celulares que caracterizam a dor neuropática.

Orientador(a): Marucia Chacur.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
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 a minha filha
Lara, aos meus pais e, em especial a
minha esposa Paula, pelo incentivo
constante à minha formação
profissional.**

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter concedido saúde para realização deste sonho!

A todos os cadáveres já dissecados e manipulados por mim. Foi estudando neles que meu amor pela Anatomia nasceu e o sonho começou. A minha eterna gratidão!

À minha mentora intelectual, Profa. Dra. Marucia Chacur, pela oportunidade, incentivo constante e confiança, a quem serei eternamente grato. Por todas as oportunidades de aprendizagem que muito contribuíram para a minha formação. “Maru, o meu muito obrigado por tudo! Você é especial! Uma pessoa de caráter admirável, de uma sensatez incrível, de um profissionalismo invejável... Obrigado chefea!

Aos meus amigos de laboratório e de vida, Joyce, Aline, Milena, Mara, Regina, Priscila, Wilma e ao meu grande parceiro, o Daniel, componentes fundamentais para a harmonia do laboratório de Neurodor. Vocês são incríveis! Obrigado galera!

Ao Adilson (Dídis, o “quero-quero”), técnico do laboratório de comunicação celular no sistema nervoso! Valeu Queridão!!!

À profa. Andréa da Silva Torráo (Dedé), pelos ensinamentos durante o estágio.

Ao amigo, Prof. Luiz Roberto Giorgetti de Britto (Britão), pelo exemplo como ser humano, chefe, docente e pesquisador.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por ter oferecido os recursos necessários para realização do sonho de ser Mestre em Ciências Morfofuncionais (Anatomia).

À Comissão de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais (Prof. Newton, Prof. Jackson e Profa. Maria Luísa) por terem acreditado no projeto inicial. À Comissão de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro para realização deste projeto.

RESUMO

Santos FM. Mobilização neural em rato *Wistar* reverte comportamento e mudanças celulares que caracterizam a dor neuropática. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

A técnica de Mobilização Neural (MOB) é um método não-invasivo que demonstrou clinicamente ser eficaz na redução da sensibilidade à dor e, conseqüentemente, na melhoria da qualidade de vida após a dor neuropática. O presente estudo examinou os efeitos da MOB sobre a sensibilidade dolorosa induzida pela constrição crônica (CCI) do nervo isquiático de ratos. A CCI foi realizada em ratos machos adultos, submetidos posteriormente a dez sessões de MOB, iniciadas 14 dias após a lesão. Durante o tratamento, os animais foram avaliados em testes comportamentais de nocicepção através dos testes para a alodinia e hiperalgesia térmica e mecânica. Ao término das dez sessões, o nervo isquiático e a medula espinal foram retirados e processados para detecção de NGF e proteína zero por análise de *Western Blot*. Os DRG's foram processados para detecção de NGF e GFAP para análise de *Western Blot* e imuno-histoquímica de fluorescência. A MOB reverteu parcialmente a resposta hiperalgesica mecânica e a alodínica desde a segunda sessão, enquanto que a hiperalgesia térmica foi bloqueada desde a quarta sessão de MOB. Com relação aos ensaios de *Western Blot*, observamos um aumento da densidade óptica para NGF e proteína zero (PO) no nervo isquiático dos animais com CCI após tratamento com MOB. Entretanto, não foi possível observar mudanças estatísticas para o NGF quando analisamos a medula espinal em todos os grupos analisados. Nos ensaios de *Western Blot* e imuno-histoquímica dos DRG's observamos uma diminuição da imunorreatividade (IR) para NGF e GFAP nos animais tratados com MOB. Assim, acreditamos que a MOB diminui os sintomas da dor neuropática induzida pela CCI do nervo isquiático, além de favorecer a regeneração do nervo isquiático devido ao aumento local de NGF e Proteína zero.

Palavras chaves: Hiperalgesia. Dor crônica. Nervo isquiático. Proteína zero. Fator de crescimento Neural. Gânglio da raiz posterior.

ABSTRACT

Santos FM. Neural mobilization reverses behavioral and cellular changes that characterize neuropathic pain in rats Wistar. [Masters Thesis (Morphofunctional Science)]- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The Neural Mobilization technique is a noninvasive method that has proved clinically effective in reducing pain sensitivity and consequently in improving quality of life after neuropathic pain. The present study examined the effects of Neural Mobilization (MOB) on pain sensitivity induced by chronic constriction injury (CCI) in rats. The CCI was performed on adult male rats, submitted thereafter to 10 sessions of MOB, each other day, starting 14 days after the CCI injury. Over the treatment period, animals were evaluated for nociception using behavior tests, such as tests for allodynia and thermal and mechanical hyperalgesia. At the end of the sessions, the nerve isquiatic and spinal cord were analyzed using Western Blot assays for neural growth factor (NGF) and protein zero (PO) and the dorsal root ganglia (DRG) were analyzed using Western Blot and immunohistochemistry assays for neural growth factor (NGF) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). The results showed that MOB treatment induced an early reduction (in the second session) of the hyperalgesia and allodynia in CCI-injured rats, which persisted until the end of the treatment. On the other hand, only after the 4th session we observed a blockede of thermal sensitivity.

Regarding cellular changes, we observed a increase of NGF and PO expression after MOB in the nerve isquiatic when compared to CCI animals. We also observed a decrease of NGF and GFAP expression after MOB in the DRG when compared to CCI animals. In spinal cord no observed statistically difference. Was observed these data provide evidence that MOB treatment reverses pain symptoms in CCI-injured rats and decreases the level of GFAP and NGF in DRG. In addition to promoting the regeneration of the isquiatic nerve due to increased local NGF and protein zero.

Key words: Hyperalgesia. chronic pain. isquiatic nerve. Protein zero. Neural growth factor. Dorsal root ganglia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ilustração do teste de Mobilização Neural - elevação da perna estendida.....	25
Figura 2 -	Ilustração da dissecação do sistema nervoso realizado por Rufus Weaver 1835.....	26
Figura 3 -	Ilustração do modelo de injúria por constrição crônica (CCI).....	33
Figura 4AE-	Ilustração da técnica de Mobilização Neural adaptada no laboratório de neuroanatomia funcional da dor.....	35
Figura 5 -	Ilustração do teste de pressão da pata - Randall e Selito.....	36
Figura 6 -	Ilustração do teste de filamentos de von frey.....	37
Figura 7 -	Ilustração do teste de hiperalgesia térmica – Hargreaves.....	38
Figura 8 -	Evolução do limiar nociceptivo após a cirurgia pela avaliação da estimulação mecânica nociceptiva em ratos.....	43
Figura 9 -	Evolução do limiar nociceptivo após a cirurgia pela avaliação da alodinia mecânica em ratos.....	44
Figura 10 -	Evolução do limiar nociceptivo após a cirurgia pela avaliação da hiperalgesia térmica em ratos.....	45
Figura 11A -	Evolução do limiar nociceptivo (hiperalgesia mecânica) após a cirurgia e tratamento com a técnica de Mobilização Neural em ratos	46
Figura 11B -	Evolução do limiar nociceptivo (alodinia) após a cirurgia e tratamento com a técnica de Mobilização Neural em ratos	47
Figura 11C -	Evolução do limiar nociceptivo (hiperalgesia térmica) após a cirurgia e tratamento com a técnica de Mobilização Neural em ratos	47

Figura 12 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na síntese do fator de crescimento neural (NGF) no nervo isquiático de ratos.	49
Figura 13-	Técnica de Mobilização Neural na síntese do NGF no gânglio da raiz posterior de ratos.....	50
Figura 14 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na síntese do fator de crescimento neural (NGF) na medula espinal de ratos.	51
Figura 15 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na atividade da proteína acídica fibrilar (GFAP) no gânglio da raiz posterior de ratos.....	52
Figura 16 -	Efeito da Técnica de Mobilização Neural na síntese da Proteína Zero (PO) no nervo isquiático de ratos	53
Figura 17 -	A Imuno-histoquímica de fluorescência mostra a expressão de NGF no DRG (segmento - L4).....	54
Figura 18 -	Imuno-histoquímica de fluorescência mostra a expressão de GFAP no DRG (Segmento L4).....	55
Figura 19 -	Imuno-histoquímica de fluorescência mostra a expressão de GFAP e NGF no DRG (Segmento L4).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

14d	Décimo quarto dia
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
C5	Quinta vértebra cervical
C6	Sexta vertebra cervical
CCI	Injúria por Constrição Crônica
CCI MOB	Injúria por Constrição Crônica tratados com a técnica de Mobilização Neural
CCI-14d	Injúria por constrição crônica – décimo quarto dia
DRG	Gânglio da Raiz Dorsal - (Posterior)
FOP	Falso operado (<i>sham</i>)
FOP MOB	Falso operado tratados com a técnica de Mobilização Neural
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP-IR	Proteína Glial Fibrilar Ácida imunoreativa
IEC	Índice Estático do Ciático - (isquiático)
IFC	Índice Funcional do Ciático - (isquiático)
L3	Terceira Vértebra Lombar
L5	Quinta Vértebra Lombar

L6	Sexta Vértebra Lombar
MF	Medida Final
MF 14d	Medida Final 14 dias após CCI
MI	Medida Inicial
MOB	Mobilização Neural
NGF	Fator de Crescimento Neural
NGF-IR	Fator de Crescimento Neural imunorreativo
NO	Óxido nítrico
NT-3	Neurotrofina três
NT-4	Neurotrofina quarto
p75NTR	Receptor neurotrófico – p75
PO	Proteína Zero
SLR	Elevação da Perna Estendida
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNF-1	Fator de necrose tumoral um
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

TrKa Receptor tirosina quinase A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	17
1.2 Modelos experimentais para indução de dor neuropática	18
1.3 Fator de Crescimento Neural e Dor	19
1.4 Mudanças em células satélites e NGF que acompanham a dor neuropática	20
1.5 Células de Schwann e Proteína Zero	23
1.6 Tratamento da dor neuropática por Mobilização Neural	24
1.7 Justificativa e hipótese	30
1.8 Objetivos	31
1.8.1 <i>Objetivos específicos</i>	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Indução da dor neuropática	32
2.2 Planejamento dos grupos experimentais	33
2.2.1 <i>Grupo crônico – 14 dias</i>	33
2.3 Procedimento terapêutico – Técnica de Mobilização Neural	34
2.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa	36
2.4.1 <i>Determinação da hiperalgesia mecânica</i>	36
2.4.2 <i>Determinação da Alodinia Mecânica</i>	37
2.4.3 <i>Determinação da Hiperalgesia Térmica</i>	37
2.5 Ensaio de <i>Western blot</i>	39
2.6 Experimentos de imuno-histoquímica de fluorescência para ilustração e demonstração da presença de NGF e/ou colocalização com GFAP no DRG	40
2.7 Análise estatística	41
3 RESULTADOS	42
3.1 Envolvimento da Técnica de Mobilização Neural 14 dias após indução da dor neuropática	42
3.1.1 <i>Caracterização do modelo experimental - Injúria por constrição crônica (CCI)</i>	42
3.1.1.1 Avaliação da dor neuropática através da Hiperalgesia Mecânica	42
3.1.1.2 Através da Alodinia Mecânica	43

3.1.1.3 Através da Hiperalgesia Térmica.....	44
<i>3.1.2 Efeito da Mobilização Neural na dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático.</i>	<i>45</i>
3.1.2.1 Avaliação da dor neuropática nos animais operados e tratados	45
<i>3.1.3 Efeitos da Mobilização Neural nos parâmetros celulares por meio de ensaios de Western Blot</i>	<i>48</i>
3.1.3.1 Efeitos sobre o Fator de Crescimento Neural (NGF)	48
<i>3.1.3.1.1 Nervo isquiático</i>	<i>48</i>
<i>3.1.3.1.2 No gânglio da raiz posterior (DRG) - segmento L4- L6.....</i>	<i>49</i>
<i>3.1.3.1.3 Medula espinal.....</i>	<i>50</i>
3.1.3.2 Efeitos sobre a proteína acídica fibrilar (GFAP) no gânglio da raiz posterior (DRG)	51
<i>3.1.3.2.1 No gânglio da raiz posterior (DRG) - segmento de L4-L6.....</i>	<i>51</i>
3.1.3.3 Efeito sobre a Proteína Zero (PO) do nervo isquiático	52
<i>3.1.3.3.1 Nervo isquiático</i>	<i>52</i>
<i>3.1.4 Efeitos da Mobilização Neural nos parâmetros celulares por meio de ensaios de imunohistoquímica de fluorescência</i>	<i>53</i>
3.1.4.1 Ilustração e demonstração do efeito sobre o Fator de Crescimento Neural (NGF) no gânglio da raiz posterior (segmento L4) de ratos com dor neuropática crônica tratados com Mobilização Neural	53
3.1.4.2 Ilustração e demonstração do efeito da proteína acídica fibrilar (GFAP) no gânglio da raiz posterior (segmento - L4) de ratos com dor neuropática crônica tratados com Mobilização Neural	54
3.1.4.3 Ilustração e demonstração do efeito da dupla marcação da proteína glial fibrilar acídica (GFAP) com o Fator de Crescimento Neural (NGF) no gânglio da raiz posterior (segmento - L4) de ratos com dor neuropática crônica tratada com Mobilização Neural	56
4 DISCUSSÃO	58
5 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Dor neuropática

A lesão do nervo espinal em humanos resulta, muitas vezes, em dor persistente ou crônica, caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia (dor em resposta a estímulos não lesivos) e hiperalgesia (dor exagerada em resposta a estímulos lesivos) (Payne e Norfleet, 1986). A ocorrência de lesões no sistema nervoso periférico (SNP) e na medula espinal contribui para o desenvolvimento da dor neuropática. Esta inclui a presença de focos ectópicos de lesão nas fibras nervosas periféricas, as quais mantêm contínuos os impulsos nervosos aferentes para o sistema nervoso central (SNC). A entrada destes impulsos ectópicos na medula espinal sensibiliza os neurônios da coluna posterior da medula (Devor, 1994). Estes fatos, associados à sensibilização central, na vigência de lesão de nervos espinais, contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática (Devor e Seltzer, 1999; Schaible, 2007). As extremidades do nervo lesionado se aderem após a lesão ou trauma, podendo formar neuroma, que pode dar origem a descargas espontâneas e hipersensibilidade a estímulos mecânicos, também presentes durante processo de dor neuropática.

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 e Levine, 2002; Sah, Ossipo e Porreca, 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 nos últimos anos (Galer, 1995). Entretanto a resposta dos pacientes com dor neuropática para muitos dos tratamentos não é satisfatória. Os tratamentos utilizados na prática clínica incluem lesões neurocirúrgicas, tratamentos medicamentosos como, por exemplo, antidepressivos tricíclicos, anticonvulsiantes, administração sistêmica de anestésicos, agentes tópicos, analgésicos narcóticos e não narcóticos antiarrítmicos (Galer, 1995; Sah, Ossipo e Porreca, 2003); e tratamento não medicamentoso tal como fisioterapia. Um dos procedimentos utilizados por fisioterapeutas no tratamento da dor neuropática são as técnicas de Mobilização Neural, as quais

cl clinicamente têm demonstrado excelentes resultados em pacientes com este tipo de dor (Dwornik et al., 2007).

Assim, o conhecimento da fisiopatologia da dor é uma importante ferramenta para o entendimento dos mecanismos desencadeadores dos processos dolorosos.

1.2 Modelos experimentais para indução de dor neuropática

Na literatura encontramos diferentes modelos animais para a indução da dor neuropática, os quais têm sido desenvolvidos para testar e comparar diversos tipos de fármacos e para auxiliar num melhor entendimento do seu mecanismo de ação. Considerando que esses modelos induzem alterações comportamentais nos roedores, como hiperalgesia e dor espontânea, similares aos sintomas observados durante a dor neuropática em humanos, estudos que utilizam estas ferramentas e descrevem os diversos processos fisiopatológicos periféricos e centrais, que ocorrem após a lesão de nervo, podem ser a base que permite delinear os mecanismos da dor neuropática (Backonja, 2003).

Estes modelos podem ser divididos em: 1) modelos de neuropatia do nervo espinal induzida por doença, nos quais se incluem a dor neuropática acarretada por diabetes Mellitus e o modelo de neuralgia pós-herpética; 2) modelos de dor central, os quais consistem em lesão da medula espinal, que pode ser por contusão, lesão fotoquímica ou agentes citotóxicos; 3) modelos de lesão de nervos espinais, tais como neuroma, lesão por constrição crônica (*chronic constriction injury* – CCI), ligação parcial do nervo isquiático, ligação de nervos espinais, crioneurólise do isquiático, ressecção do ramo caudal inferior e neurite inflamatória do isquiático (Wang e Wang, 2003).

A transecção total ou ligação do nervo isquiático reproduzem as condições clínicas de amputação, enquanto que a CCI do isquiático, por possuir ligaduras ao redor do nervo, simula as condições clínicas de compressão nervosa crônica, como a irritação do nervo na síndrome do túnel do carpo ou síndrome do músculo piriforme (Zimmermann, 2001). Esses sintomas iniciam-se do 1º ao 5º dia após a indução da lesão, e se estendem por, pelo menos, dois meses (Bennett e Xie, 1988). As alterações estruturais envolvem degeneração de todas as fibras A e a maioria das fibras C (Basbaum et al., 1991). Assim, acreditamos que o modelo de indução da dor neuropática que consiste em quatro amarraduras frouxas ao redor do nervo isquiático (Bennett e Xie, 1988)

possui grande aproximação clínica como, por exemplo, nos casos de síndrome do túnel do carpo ou compressão do nervo isquiático, sendo, portanto, utilizada em nosso projeto de pesquisa para caracterizar os sinais da neuropatia periférica.

1.3 Fator de Crescimento Neural e Dor

No ano de 1949, a bióloga Rita Levi-Montalcini identificou um neuropeptídeo essencial para a sobrevivência de células neurais, o NGF (*Neural Growth Factor* - Fator de crescimento Neural) (Levi-Montalcini, 1987).

O NGF desempenha um papel muito importante na sobrevivência, diferenciação e crescimento neural; esse neuropeptídeo é produzido e liberado pelos tecidos alvos sendo absorvido de forma retrógrada para manter a sobrevivência neuronal (Bear, Connors e Paradiso, 2002; Pezet e McMahon, 2006).

O NGF pertence ao grupo de substâncias neurotróficas como, por exemplo, NT-3 e NT-4 conhecidos como fatores neurotróficos derivados do encéfalo (BDNF) (Bear, Connors e Paradiso, 2002). O NGF acopla-se especificamente a dois receptores que pertencem à classe de nociceptores: O primeiro receptor é a Tirosina Kinase (Trka) e o segundo, o p 75 (p75NTR). Cada tipo de receptor relaciona-se a uma função como, por exemplo, o receptor Tirosina Kinase (Trka) quando ativado induz diferenciação e a sobrevivência neural; o p75, aparentemente induz a morte celular programada (apoptose) (Chao, 2003).

Clinicamente, devido ao seu amplo potencial terapêutico, o NGF vem sendo utilizado no tratamento de diversas doenças neurodegenerativas e também em processos inflamatórios por ser um importante mediador da inflamação (Apfel, 2002).

Em relação aos processos inflamatórios, diversos trabalhos sugerem que a utilização de anticorpos contra NGF é uma ótima alternativa terapêutica contra a hiperalgesia induzida por esses processos (Ro et al., 1999).

No estudo realizado por Herzberg et al., (1997), a lesão por constrição crônica do nervo isquiático induziu a hiperalgesia térmica, mecânica e alodinia. Neste trabalho, os autores sugeriram o envolvimento do NGF no desenvolvimento da hiperalgesia, a qual foi confirmada pelo aumento de RNAm que codifica o NGF tanto no nervo isquiático como no gânglio da raiz posterior. A aplicação de soro anti-NGF retardou o aparecimento da hiperalgesia causada por

processo inflamatório, demonstrando assim, que o NGF é um fator importante no aparecimento de hiperalgesia associada à mononeuropatia (Herzberg et al., 1997).

Quanto ao efeito protetor do NGF, diversos trabalhos vêm sendo realizado neste âmbito. Num modelo animal utilizando ratos Sprague-Dawley, os pesquisadores deslocaram a retina desses animais com injeção de solução de 0.1% de hialuronato de sódio, induzindo a morte do epitélio neurosensorial da retina. A injeção intravitreal de NGF exógeno, segundo os autores, promoveu proteção da retina deslocada por prevenir apoptose celular após o deslocamento (Sun et al., 2008). Além disso, pesquisadores seccionaram o nervo isquiático e suturaram os segmentos lesados num tubo de polietileno; em seguida aplicaram colágenos e/ou NGF; seis semanas após sua aplicação, as células do DRG (nível de L3 e L5) foram preenchidas retrogradamente com peroxidase, demonstrando que a adição de NGF pode aumentar a taxa de regeneração celular (Silva e Langone, 1989).

1.4 Mudanças em células satélites e NGF que acompanham a dor neuropática

A dor induzida por inflamação periférica ou por dor neuropática (neuropatia), atualmente vem sendo associada ao envolvimento de células da glia localizadas na medula espinal (Ledeboer et al., 2005; Watkins, Milligan e Maier, 2003). A importância das células da glia na 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).

As células da glia sintetizam várias substâncias, muitas das quais são também liberadas por neurônios nociceptivos que modulam a resposta de dor, dentre as quais podemos citar as prostaglandinas, o glutamato, o ácido araquidônico, o NO e as citocinas (Agullo, Baltrons e Garcia, 1995; Hartung et al., 1988; Marriott, Wilkin e Wood, 1991; Stella et al., 1994).

No sistema nervoso central, os principais tipos de células da glia são: os oligodendrócitos, os astrócitos (macroglia) e a microglia (Haydon, 2001). Os astrócitos constituem cerca de 50% das células gliais (Kimmelberg, 1983), contribuindo para a homeostasia e para a regulação de concentrações de íons como, por exemplo, o K^+ . Evidências recentes demonstraram a existência de interação entre astrócitos e neurônios (Araque, Carmignoto e Haydon, 2001; Perea e Araque, 2002). Estas evidências são baseadas em estudos empregando células em cultura de ratos onde se

Introdução e Revisão da Literatura

observou 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). Todavia, os oligodentrócitos são responsáveis pela mielinização das fibras nervosas no sistema nervoso central e podem ser considerados como equivalente às células de Schwann do sistema nervoso periférico. A microglia é 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 neurotransmissores e mudanças funcionais, incluindo a liberação de mediadores citotóxicos e/ou inflamatórios (Colburn e DeLeo, 1999).

Dados mais recentes têm demonstrado que os astrócitos e a microglia, além de participarem de processos inflamatórios, têm papel relevante para a manutenção de processos nociceptivos (Allen e Barres, 2009; Chacur et al., 2004a; Cirillo et al., 2010; Milligan et al., 2003; Watkins, Milligan e Maier, 2003; Xie, Strong e Zhang, 2009).

O conhecimento sobre a participação das células da glia no sistema nervoso periférico que é constituído anatomicamente por terminações nervosas, nervos e gânglios espinais ainda é limitado. Neste sistema, os corpos dos neurônios situam-se nos gânglios espinais. Os gânglios espinais são denominados de gânglios da raiz posterior (Dorsal Root Ganglion - DRG). São estruturas arredondadas devido a existência de corpos de neurônios pseudounipolares, que são as que apresentam um prolongamento central e outro periférico. Toda informação proveniente da periferia como, por exemplo, estímulos de tato, pressão, temperatura e dor passam através destes gânglios espinais antes de seguirem para a medula espinal, local em que farão sinapses com outros neurônios (Moore, Dalley e de Araújo, 2007; Schünke, 2006).

Os corpos dos neurônios pseudounipolares que constituem os gânglios espinais são envolvidos por células da glia chamadas de células satélites, sendo que cada neurônio possui seu próprio grupamento de células gliais (Pannese, 1981). A célula satélite é um pequeno tipo de célula que forma uma unidade funcional que sustenta e modula os neurônios presentes nos gânglios espinais, por meio de canais de potássio e liberação de neuromediadores como, por exemplo, o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA). Por ser considerada uma célula de defesa, em situações de lesão do nervo periférico, as células satélites presentes nos gânglios espinais se hipertrofiaram aumentando a expressão de marcadores gliais como o fator de necrose

Introdução e Revisão da Literatura

tumoral alfa (TNF- α), receptor para o fator de necrose tumoral (TNF-1), neurotrofina 3 (NT-3) e fator de crescimento neural (NGF) (Sorkin e Schafer, 2007).

Nesse sentido, Liu et al., (2003) investigaram a distribuição de neurotrofina três (NT-3), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e NGF nas células satélites presentes no gânglio da raiz posterior de gatos adultos. Para isto, o gânglio de (L6) foi seccionado e posteriormente submetido à imunomarcação utilizando anticorpos específicos para: NGF, BDNF e NT-3. O resultado apontou presença destes neuromediadores nas células satélites do DRG (Liu et al., 2003).

Fukui et al., (2010) destacaram que o NGF é um importante mediador da dor no DRG. Os autores mencionam inúmeros trabalhos relacionando o receptor Tirosina kinase A (Trka) e receptor neurotrófico p 75 (p75NTR), ambos para NGF, na transmissão da dor. Neste estudo os autores utilizaram como modelo experimental a injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) e avaliaram a expressão de calcitonina (neuropeptídeo) no DRG (nível de L5) por meio de utilização de anticorpo que inibe o receptor p75. O estudo revelou, por meio do método de imunohistoquímica e testes comportamentais, que os animais com CCI quando não tratados apresentam um aumento da expressão do receptor p75 no gânglio da raiz posterior, bem como da alodinia. A aplicação de anticorpos contra os receptores p75 existentes no gânglio da raiz posterior diminui a alodinia mecânica e a expressão de CGRP nos neurônios do gânglio da raiz posterior, bem como, melhora a dor (Fukui et al., 2010).

Ainda, o estudo realizado por Pannese e Procacci (2002), utilizando os métodos de microscopia de luz e microscopia eletrônica identificou os receptores p75 e Trka nas células satélites pelo método de imunohistoquímica em transecções de gânglios da raiz posterior, além de identificarem os mesmos receptores nos corpos neuronais que constituem os gânglios. Os autores sugerem que, pelo fato das células satélites terem receptores específicos para NGF, isso pode significar que essas células atuam como reservatórios desta neurotrofina, a qual pode ser liberada e consequentemente utilizada pelos neurônios presentes no gânglio da raiz posterior (Pannese e Procacci, 2002). No ano de 2009, Ohara et al., destacaram a importância das células satélites no envolvimento da dor, bem como, a participação das células de Schwann como agente liberador de mediadores da inflamação (Ohara et al., 2009).

Atualmente, existem poucos dados na literatura a respeito do papel das células gliais (satélite) em modelos de dor neuropática. Nós acreditamos que o NGF armazenado nas células

satélites conforme descrito por Pannese (2002) pode sensibilizar os neurônios sensoriais dos gânglios espinais, fato que contribui para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.

1.5 Células de Schwann e Proteína Zero

As células de Schwann envolvem os axônios que pertencem à divisão periférica do sistema nervoso com a finalidade de formar a bainha de mielina.

Essas células participam da regeneração de axônios em casos de lesões que ocorrem no sistema nervoso periférico como, por exemplo, em casos de compressão das raízes nervosas, pinçamento de nervo, entre outras lesões. Cada axônio é envolvido por um revestimento de múltiplas camadas de proteínas e lipídios que formam a bainha de mielina. A bainha de mielina isola eletricamente os axônios de certos grupos de neurônio e com isso aumenta a velocidade de propagação do impulso elétrico. A célula de Schwann inicia seu trabalho numa fase inicial do desenvolvimento fetal. Cada célula de Schwann enrola-se várias vezes em um único axônio. Múltiplas camadas de membrana plasmática glial enovelam-se ao redor dos axônios, com o citoplasma e o núcleo das células de Schwann, formando a camada mais externa. A parte mais interna é chamada de bainha de mielina. A porção mais externa desta camada é chamada de neurolena, existente somente no sistema nervoso periférico sendo responsável por regenerar os axônios lesados por meio de tubos que direcionam o crescimento de novos axônios (Tortora, 2007).

Assim, as células de Schwann desempenham também papel importante na regeneração do sistema nervoso periférico. A regeneração ocorre devido a essas células sintetizarem uma série de moléculas que favorecem o crescimento das fibras nervosas. Estas moléculas são: NGF, BDNF e outros fatores de crescimento associados à matriz extracelular como o complexo proteoglicana-laminina (Chavez, 1997; Fox, 2007; Tortora, 2007).

O sucesso da regeneração do sistema nervoso periférico depende em grande parte da manutenção da lâmina basal, devido à remoção eficaz dos resíduos de mielina por macrófagos e células de Schwann. A expressão de fatores neurotróficos pelas células de Schwann regula o programa de crescimento intrínseco nos neurônios do sistema nervoso periférico. Em casos de lesão axonal, inicialmente ocorre à degeneração Walleriana, seguida por brotamento axonal,

formação de cones de crescimento neuronal que é dependente da ativação de cascatas complexas de sinalização, que envolve vários receptores.

A bainha de mielina é dependente da presença de moléculas altamente adesivas que mantém a membrana basal bem aderida ao axônio. A glicoproteína (Proteína zero – P0) é o principal componente do sistema nervoso periférico responsável pela formação da bainha de mielina nos mamíferos (Rotenstein et al., 2008) e será alvo de estudo em nosso trabalho.

1.6 Tratamento da dor neuropática por Mobilização Neural

A Mobilização Neural é uma técnica de terapia manual, não invasiva, aplicada por fisioterapeutas. A técnica visa restaurar a mobilidade e a elasticidade do sistema nervoso periférico por meio de tensões que são impostas aos troncos nervosos, raízes, nervos, medula espinal e seus respectivos envoltórios, as meninges, devido a oscilações e angulações articulares (Butler, 1991). Estudo randomizado, de mensurações repetidas, duplo cego, placebo controlado demonstra que a técnica de Mobilização Neural aumenta a condutância elétrica da pele em pacientes assintomáticos submetidos à manobra de deslizamento das raízes de C5 e C6 (Vincenzino, Collins e Wright, 1994). Neste sentido, uma revisão Cochrane realizada por Gross et al., (2004), contendo 42% dos estudos com alta qualidade metodologia comparando terapia manipulativa e Mobilização Neural em pacientes com lesão mecânica no pescoço destaca que tanto a terapia manipulativa quanto a Mobilização Neural quando aplicadas junto com exercícios terapêuticos são benéficas para os pacientes com este tipo de lesão (Gross et al., 2004).

Atualmente, a técnica vem sendo utilizada como método de avaliação e tratamento das mais diversas patologias que acometem o sistema nervoso central (acidente vascular encefálico) ou periférico (hérnias de disco ou síndrome do túnel do carpo) (Heebner e Roddey, 2008; Muller et al., 2004; Oskay et al., 2010) 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; Ekstrom e Holden, 2002; Júnior e Teixeira, 2007; Sweeney e Harms, 1996).

A prova que existe uma integração entre sistema nervoso e aparelho locomotor é percebida quando certos movimentos combinados são executados, momento em que os nervos são levados a uma grande tensão, que é transmitida em direção as raízes nervosas e,

consequentemente, ao neuroeixo (Smaniotto e 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*) em que ocorre que os movimentos angulares das articulares tencionam os envoltórios que envolvem os axônios (endoneuro, perineuro e epineuro) que compõem o nervo isquiático (figura 1).

Figura 1 - Ilustração do teste de Mobilização Neural - Elevação da perna estendida (SLR)

FONTE: Butler, 1991.

Lew e Briggs (1997), para entender o conceito de integração entre sistema locomotor e sistema nervoso, dissecaram cinco cadáveres ainda não formalizados com o objetivo de avaliar a relação existente entre flexão da articulação do quadril e flexão cervical com a medula espinal. Para isto, os autores dissecaram a região da terceira vértebra lombar (L3) para expor a medula espinal. Após a exposição da medula espinal, realizava-se flexão cervical, posteriormente flexão de quadril e flexão de ambos concomitantemente. Os autores concluíram que os movimentos de flexão cervical e flexão do quadril influenciam diretamente na medula espinal devido à conexão existente entre o aparelho locomotor e com isso os autores sugeriram que esses movimentos devem ser combinados em determinados tipos de terapia (Lew e Briggs, 1997). Neste sentido, Ellis et al., (2008) demonstraram, utilizando imagens de ultrassom e vídeo sequência, in vivo, o deslizamento do nervo isquiático durante a aplicação da técnica de Mobilização Neural (Ellis et al., 2008), fato também comprovado no estudo de Adel (2011). Neste estudo o autor reabilitou pacientes com dor na região lombar, sendo os grupos divididos da seguinte forma: Grupo A, pacientes tratados com mobilização vertebral (técnica diferente da Mobilização Neural) e

Introdução e Revisão da Literatura

exercícios terapêuticos; Grupo B, pacientes também tratados com mobilização vertebral, exercícios terapêuticos e SLR. Segundo o autor o grupo que teve a adição dos movimentos articulares (SLR) na terapia obteve analgesia quando comparado com o outro grupo (Adel, 2011).

O desenho clássico de Rufus Weaver, preparado em 1835, e denominado “Harriet” doado pela Universidade Drexel da Philadelphia e utilizada no estudo Walsh (2005) (Walsh, 2005), aclara simbolicamente a conexão elétrica, química e mecânica que existe entre o sistema nervoso central e periférico (Figura 2).

Figura 2 - Ilustração da dissecação do sistema nervoso realizado por Rufus Weaver em 1835

Dissecação do sistema nervoso realizada por Rufus Weaver em 1835, demonstrando o conceito de continuidade do sistema nervoso – Imagem em preto e branco. (Cortesia da Universidade de Drexel, Philadelphia)
FONTE: Walsh, 2005.

Embora a técnica de Mobilização Neural faça sucesso no novo milênio, os primeiro achados clínicos que iriam certamente ser aprimorados mais tarde surgiram em meados de 1979 com o trabalho histórico de Alf Breig (Breig e Troup, 1979).

Breig descobriu que o aparelho locomotor tinha um impacto forte sobre o sistema nervoso, ou seja, todo movimento para ser realizados, com uma amplitude de movimento normal, dependia de uma boa elasticidade do tecido neural, especificamente os nervos, de modo 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 e Troup, 1979). Durante a execução dos movimentos corporais os tecidos conjuntivos como o endoneuro, o perineuro e o epineuro protegem os axônios das forças de tensão e compressão incidentes sobre

Introdução e Revisão da Literatura

os nervos periféricos (Bessa, 2004). A relação sadia, longe de injúrias, entre nervos periféricos e aparelho locomotor em relação as suas interfaces teciduais permite aos indivíduos mover-se de forma livre e sem dor (Zamberlan e Kerppers, 2007).

Com o crescimento da fisioterapia várias técnicas de terapia manual vêm sendo estudadas por pesquisadores como, por exemplo, Reeducação Postural Global (Vanti et al., 2007), Mobilização Maitland (Maricar, Shacklady e McLoughlin, 2009), Mobilização articular (Martins et al., 2011; Moss, Sluka e Wright, 2007; Sluka et al., 2006; Sluka e Wright, 2001) e inclusive a técnica de Mobilização Neural que está aos poucos colhendo frutos de aquisição de novos conhecimentos como neurobiologia, biomecânica e fisiologia.

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 integração existente, ou seja, estresses impostos ao sistema nervoso periférico durante 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 (Salgado, 2004).

Apesar da elasticidade, o sistema nervoso sempre realiza sua função principal que é a propagação de impulsos elétricos chamados de potenciais de ação. No entanto, as propagações de impulsos elétricos dependem da integridade normal do tecido nervoso, ou seja, uma neurodinâmica normal (Smaniotto e Fontequ, 2004).

Como já descrito anteriormente os nervos frequentemente são comprometidos por lesões. As lesões como, por exemplo, compressão nervosa, causam alteração mecânica (diminuição da elasticidade do nervo) das fibras nervosas ocasionando diminuição ao fluxo sanguíneo levando a uma isquemia e conseqüentemente lesão local (Butler, 1991).

A técnica de Mobilização Neural restabelece as 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 realizada e por não ser uma técnica invasiva pode ser utilizada como terapêutica exclusiva, mas dependendo da situação

Introdução e Revisão da Literatura

clínica de cada paciente outras terapias podem ser incluídas no plano de tratamento (Dwornik et al., 2007). O restabelecimento da mecânica neural (neurodinâmica) ocorre por meio de pequenas oscilações e tensão no tecido nervoso, que induz a melhora da dor e dos tecidos adjacente como, por exemplo, o aparelho locomotor. Desta forma a técnica melhora a qualidade de vida dos mais diversos pacientes com injúrias, por diminuir a dor (Dwornik et al., 2009), aumentar a perfusão do tecido nervoso, reduzir o edema do tecido nervoso, aumentar o transporte axonal ortodrômico e antidrômico, reduzir o tônus simpático, restaurar a função neuromecânica normal e restaurar a função fisiológica normal das células do tecido nervoso (Butler, 1991; Santos, 2004).

A medicina do novo milênio baseia-se em evidências clínicas e, pensando assim, estudos randomizados, placebo controlado e revisão sistemática sobre a Mobilização Neural vêm sendo realizados (Bialosky et al., 2009; Ellis e Hing, 2008). Ellis e Hing (2008) realizaram uma revisão sistemática, a qual teve como objetivo avaliar a evidência clínica ou eficácia terapêutica da técnica de Mobilização Neural em estudos randomizados controlados, utilizando a escala *Physiotherapy Evidence Database* (PEDro). Esta revisão 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 destaca a importância de novas pesquisas para comprovar a eficácia terapêutica desta técnica. Os autores destacaram que a técnica de Mobilização Neural possui evidência clínica limitada e sugerem novas pesquisas e uma reavaliação dos efeitos desta técnica (Ellis e Hing, 2008). No mesmo ano, Shacklock comentou o estudo de Ellis e Hing. O autor destaca a importância desse tipo de estudo e ressalta também que a revisão sistemática aclara uma série de pontos chave importante sobre a Mobilização Neural. No entanto, o autor declara que Ellis e Hing se precipitaram em afirmar que a técnica de Mobilização Neural possui evidência clínica limitada e que outras ferramentas de avaliação de estudos randomizados, além da escala PEDro, devem ser utilizadas (Shacklock, 2008).

A evidência clínica da técnica de Mobilização Neural não é recente. Em 1996, Sweeney e Harms descreveram que a alodinia mecânica é bem documentada como problema clínico em pacientes com lesão dos nervos espinais. Neste estudo, os autores concluíram que a Mobilização diminui a alodinia mecânica e aumenta a amplitude de movimento no membro comprometido, sendo, portanto, uma ferramenta útil na avaliação e no tratamento dos indivíduos com alodinia mecânica (Sweeney e Harms, 1996). O sucesso da aplicação da Mobilização Neural também

Introdução e Revisão da Literatura

pôde ser observado no estudo realizado por Oskay et al., (2010) em que os autores observaram melhora da força muscular no membro superior, avaliada por dinamômetro, bem como melhora da dor de pacientes com síndrome do túnel do carpo de leve a moderado (Oskay et al., 2010).

Walsh (2005) descreveu que estudos clínicos e pré clínicos têm 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 esta funciona ainda não é bem conhecido, destacando também a falta de padronização da técnica como duração, frequência e amplitude de movimento (Walsh, 2005).

Em relação ao emprego da técnica de Mobilização Neural na regeneração de nervos espinais, estudos realizados em ratos submetidos à Mobilização Neural após lesão traumática por esmagamento do nervo isquiático (1, 5 e 10 dias) – axonotmese demonstraram claramente que essa técnica induziu a recuperação funcional do nervo isquiático com a utilização de IFC (índice funcional do ciático) e IEC (índice estático do ciático) (Martins, 2009). A técnica ocasionou redução significativa da alodinia mecânica, mas não da alodinia ao frio. Os tratamentos com Mobilização Neural a partir do primeiro e quinto dia influenciaram no processo de regeneração do nervo isquiático, refletidos nos aumentos significativos da espessura da bainha de mielina e na densidade de fibras mielinizadas (Martins, 2009). No mesmo ano utilizando o modelo de contração crônica do nervo isquiático em ratos (CCI), Bertolini et al., (2009), mostraram que a técnica de Mobilização Neural e o alongamento estático reduziu a dor neuropática dos ratos. Os autores concluíram que as duas formas de terapia foram eficazes na redução da dor, sendo a Mobilização Neural mais efetiva (Bertolini et al., 2009).

No entanto a técnica de Mobilização Neural apesar de melhorar a qualidade de vida dos mais diversos pacientes com injúrias (Butler, 1991; Santos, 2004), ainda carece de pesquisa pré clínica e/ou clínica com melhor qualidade metodológica, como randomização dos grupos, tempo de tratamento, amplitude de movimento e frequência de tratamento (Ellis e Hing, 2008; Walsh, 2005).

Assim, acreditamos que por meio da pesquisa pré clínica utilizando ratos para a padronizando da técnica de Mobilização Neural e utilizando ferramentas de pesquisa básica avançada, como *Western Blot*, possamos elucidar os mecanismos que envolvem a melhora da dor e a qualidade de vida dos mais diversos paciente com dor neuropática.

1.7 Justificativa e hipótese

Alternativas terapêuticas para o tratamento da dor neuropática se fazem necessárias, de modo que esta modalidade de dor não responde satisfatoriamente a nenhum tipo de intervenção convencional como cirurgias e/ou medicamentos.

A fisioterapia tem demonstrado por meio da técnica de Mobilização Neural ser eficiente para a melhora da qualidade de vida dos pacientes com este tipo de dor. O presente estudo torna-se importante, devido à escassez de estudos demonstrando os efeitos da técnica de Mobilização Neural, uma vez que esta técnica é capaz de induzir analgesia na dor crônica que é clinicamente relevante e de difícil tratamento. Acreditamos que entendendo melhor os mecanismos envolvidos durante os processos de dor e analgesia, dentre eles o envolvimento do fator de crescimento neural (responsável pela sobrevivência, diferenciação, crescimento neural e manutenção da dor), a participação da proteína zero (responsável pela mielinização) e células gliais, estaremos contribuindo para o embasamento e o aperfeiçoamento da técnica de Mobilização Neural. Ainda, estaremos elucidando os mecanismos envolvidos na dor neuropática. Assim, acreditamos que podemos contribuir de forma efetiva para os tratamentos clínicos empregados neste tipo de dor decorrente de lesões como, por exemplo, hérnias de disco, pinçamento de nervos, síndrome do túnel do carpo, entre outras síndromes compressivas.

1.8 Objetivos

Utilizando o rato *Wistar*, visamos avaliar a eficácia da técnica de Mobilização Neural como tratamento da dor neuropática e seus efeitos sobre as alterações celulares decorrentes da CCI.

1.8.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o comportamento do animal frente à dor neuropática através dos testes de hiperalgesia mecânica, alodinia mecânica e hiperalgesia térmica;
- ✓ Padronizar os procedimentos de Mobilização Neural para ratos *Wistar*;
- ✓ Verificar as alterações na expressão do NGF no nervo isquiático, nas células satélites do gânglio da raiz posterior e na medula espinal, bem como a proteína zero no nervo isquiático de animais submetidos a CCI;
- ✓ Avaliar a eficácia do tratamento de Mobilização Neural no tratamento da dor neuropática, induzida pela CCI.

A hipótese central, comum ao conjunto desta proposta, é a interação do comportamento animal com as análises dos ensaios de *Western Blot* e imunohistoquímica de fluorescência. Espera-se que esta série de investigações contribua para maior elucidação dos mecanismos envolvidos na gênese da dor neuropática, e melhor compreensão dos mecanismos de ação da técnica de Mobilização Neural.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução da dor neuropática

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, pesando entre 180-220g (aproximadamente três meses). Todos os animais foram adquiridos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Posteriormente, os animais foram encaminhados e mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada localizada no Biotério do departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro/escuro (12:12 h). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do ICB, protocolo nº 26/84, livro 02/2010. Para a realização dos experimentos comportamentais foi utilizada a sala de comportamento do biotério do departamento de Anatomia, a qual possui isolamento acústico e temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$), local em que os animais eram mantidos por um período de 45 minutos para adaptação e posteriormente submetidos aos experimentos comportamentais. Todos os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção (Zimmermann, 1983).

Para indução de dor neuropática, foi realizada cirurgia 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 intermédia da coxa, afastando-se o músculo bíceps femoral, músculo semitendíneo e músculo semimembranáceo. Próximo à trifurcação do nervo isquiático, 7mm de distância da trifurcação, foram realizadas 4 ligaduras frouxas ao redor do nervo com fio catagute cromado 4-0, distantes entre si em aproximadamente 1mm. As ligaduras foram realizadas ao longo do nervo, até 4-5mm do ponto inicial. A incisão foi suturada em camadas, utilizando fio de sutura de seda número 4-0 (figura 3). O grupo controle foi composto por animais falso operados, submetidos à mesma incisão que os animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem a amarradura ao redor do nervo (Bennett e Xie, 1988).

Figura 3 - Ilustração do modelo de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

FONTE: Modificado de Bennett e Xie (1988).

2.2 Planejamento dos grupos experimentais

2.2.1 Grupo crônico – 14 dias

✓ Utilizamos um total de 50 animais para *Western blot* (N=10/grupo), 25 animais para imunohistoquímica de fluorescência (N= 05/grupo) e 10 animais para os testes comportamentais do grupo Halotano. Os animais foram alocados conforme divisão de grupos abaixo. Todos os animais foram inicialmente submetidos aos testes comportamentais e de acordo com os tempos de tratamento os animais foram sacrificados e a seguir, submetidos aos ensaios de *Western blot* e/ou imunohistoquímica de fluorescência.

- **Grupo 1: ratos controle (NAIVE - N= 10):** animais sem nenhum tipo de lesão ou tratamento;

- **Grupo 2: (CCI MOB - N=10):** ratos com CCI, tratados com Mobilização Neural a partir do 14º dia após a cirurgia e sacrificados após a 10ª sessão de Mobilização Neural;

- **Grupo 3: (CCI - N=10):** ratos com CCI, sem tratamento com Mobilização Neural e sacrificados na mesma data que o grupo 2;

- **Grupo 4: ratos controle (FOP MOB - N=10):** ratos falso operados, tratados com Mobilização Neural a partir do 14º dia após procedimento cirúrgico e sacrificados após a 10º sessão de Mobilização Neural;
- **Grupo 5: ratos controle (FOP – N=10):** ratos falso operados, porém sem tratamento com Mobilização Neural e sacrificados na mesma data que o grupo 4;
- **Grupo 6: (CCI – Halotano – N=10):** ratos com CCI *sem* tratamento com Mobilização Neural, mas submetido a sedação por meio de anestésico inalatório (Halotano) durante a mesma frequência de tratamento dos grupos tratados com Mobilização Neural (dez minutos). Ao término os animais foram sacrificados na mesma data que o grupo 2;

2.3 Procedimento terapêutico – Técnica de Mobilização Neural

Para tratar os ratos que foram submetidos ao modelo de dor neuropática, utilizamos como modalidade terapêutica a técnica de Mobilização Neural descrita por Butler em (1991) e adaptada em nosso laboratório (Neuroanatomia funcional da dor).

Figura 4 - Ilustração da técnica de Mobilização Neural adaptada no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da dor

A) Anesthesia; B) palpação; C) posicionamento; D) tratamento; E) manobra sensibilizante

Inicialmente os ratos foram anestesiados com Halotano (anestésico inalatório - Cristália LTDA) com fluxo contínuo de oxigênio (5 l/min) na posição de decúbito lateral esquerdo. Após a anestesia, iniciamos o tratamento dos animais, e as articulações do quadril e joelho foram palpadadas para dar início às angulações articulares. 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 (descartando o alongamento muscular). Após posicionarmos as articulações do quadril e joelho descartando o alongamento muscular, iniciamos a terapia com Mobilização Neural, momento em que a articulação do tornozelo passou a ser manipulada em dorsiflexão aproximadamente entre 20 oscilações por minuto, durante 02 minutos, com pausa de 25 segundos para descanso. No último minuto de terapia, incluímos ao tratamento a flexão cervical, com a finalidade de tencionar o neuroeixo.

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

A primeira sessão de Mobilização Neural foi iniciada no 14º dia após indução da lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI), a seguir, os animais foram tratados em dias intercalados, ou seja, dia sim, dia não, somando um total de 10 sessões de Mobilização Neural.

No final do procedimento, os animais foram sacrificados e os tecidos coletados (DRG; porção lombosacral da medula espinal) para análise.

2.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa

2.4.1 Determinação da hiperalgesia mecânica

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais utilizamos o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e Selitto (1957) (figura 5). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso da patas posterior direita do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de "retirada" do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação (Randall e Selitto, 1957).

Figura 5 - Ilustração do teste de pressão de pata – Handall e Selitto

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

2.4.2 Determinação da Alodinia Mecânica

A determinação da alodinia mecânica foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado à pata posterior direita do rato, segundo método descrito por Chaplan em 1994, modificado (figura 6). Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em caixas de acrílico com tampa com pequenas aberturas e base aberta. A caixa de acrílico fica sobre base de arame, que mede 1 metro de comprimento por 45 cm de largura, com espaço entre os arames de 1 cm. A base de arame fica fixada na parede, a dois metros do chão, para permitir acesso às patas destes animais. Para o ensaio de alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de von Frey (Aesthesiometer Semmes-Weinstein, Stoelting Co. EUA) (Figura 6). Os filamentos e seus valores respectivos em gramas são: 3.61 (0.407 g); 3.84 (0.692g); 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).

Figura 6 - Ilustração do teste de estimulação tátil- filamentos de Von Frey

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

2.4.3 Determinação da Hiperálgia Térmica

A determinação da hiperálgia térmica foi feita por meio do teste plantar descrito por (Hargreaves et al., 1988), conforme ilustrado na figura 7. O teste consiste em aquecimento por meio de fonte de luz infravermelha aplicada na região plantar da pata posterior do rato, até que o animal apresente o comportamento de retirada da pata ou o aquecimento da pata atinja o limite de tempo predeterminado (tempo de corte de 30 segundos – para que não “queime” a pata do animal caso este não a retire).

Material e Métodos

Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico individual com tampa com pequenos orifícios para ventilação e posicionados sobre uma plataforma de vidro especial, que permite a passagem de forma homogênea da luz e do calor. Uma fonte de luz infravermelha está acoplada a um monitor digital. A fonte de luz é colocada embaixo do vidro, sendo posicionada e acionada sob a pata traseira do animal. Quando a fonte de luz é posicionada e acionada pelo pesquisador, um cronômetro digital é deflagrado no monitor que fica acoplado a fonte luminosa, até que o animal retire a pata, quando, então, a fonte de luz cessa e o cronômetro pára automaticamente. 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 física do tecido do animal.

Figura 7 - Ilustração do teste de hiperalgesia térmica - Hargreaves

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

Todos os testes foram aplicados antes do procedimento cirúrgico para obtenção da medida inicial (MI), após 14 dias da lesão por constrição crônica do nervo isquiático, para avaliar a intervenção cirúrgica e, em dias intercalados, ao longo das sessões de Mobilização Neural.

Para a realização dos testes de hiperalgesia térmica, mecânica e alodinia, todos os ratos foram inicialmente habituados à gaiola, por quarenta e cinco minutos, durante dois dias que antecederam os experimentos. No dia do ensaio, os animais foram colocados nas gaiolas 20 minutos antes do início dos experimentos.

Todos os resultados obtidos nos testes comportamentais foram avaliados por meio de comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais e controles.

2.5 Ensaio de *Western blot*

Cabe mencionar que inicialmente, os animais foram avaliados nos testes comportamentais, posteriormente, submetidos aos procedimentos cirúrgicos e/ou terapêuticos, sendo sacrificados (utilizando guilhotina), após todos os procedimentos, para a retirada dos tecidos. A porção lombossacral da medula espinal (lado ipsilateral e contralateral), o nervo isquiático ipsilateral (direito) e o gânglio da raiz posterior (DRG – segmento L4-L6) dos animais experimentais (CCI e CCI MOB) e controle (FOP, FOP MOB e NAIVE) foram retirados para análise.

O conteúdo protéico do material isolado dos animais foi dosado pelo método de Bradford (Amresco, U.S.A) (Bradford, 1976). Após a quantificação de proteína total pelo método de Bradford, as amostras do nervo isquiático, da medula espinal e do gânglio da raiz posterior 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), 4mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol, e as amostras foram posteriormente fervidas em banho-Maria por cinco min. O material foi aplicado num gel de poliacrilamida a 12% e submetido a eletroforese com corrente constante de 25mA (Laemmli, 1970). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2um de diâmetro) de acordo com a técnica descrita por Towbin et al. (1979). Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Após bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé) 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10mM e NaCl 0,15M, pH 7,5), por duas horas, as membranas foram incubadas, por 18 horas a 4 °C, com anticorpos monoclonais específicos para NGF: anti-NGF (F30, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) (Wu et al., 2007) e Proteína Zero PO: anti-PO (1:1000; Abcam) (Briani et al., 2008; Jang e Svaren, 2009) e anti-GFAP (1:1000; Sigma, St. Louis, MO) (Chacur et al., 2004b). Em seguida, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase de raiz forte (goat anti rabbit HRP IgG (1:5.000; Chemicon). O controle endógeno foi marcado com β -actina (1:10000, Sigma), e ao término as membranas foram lavadas novamente com solução basal. Após a lavagem as membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL (Amersham Biosciences, NJ/EUA) de quimioluminescência e analisadas quanto à densidade óptica das bandas marcadas, utilizando o programa Scion Image

(Scion Corporation, Frederick, MD/EUA), e corrigido pela densidade óptica para a β -actina, considerando as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados.

2.6 Experimentos de imuno-histoquímica de fluorescência para ilustração e demonstração da presença de NGF e/ou colocalização com GFAP no DRG

Após o tempo de sobrevivência adequado para realização destes ensaios, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (1:1, 100 μ L/100g) 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 perfusão, o gânglio da raiz posterior (DRG-L4) foi coletado e armazenado em formaldeído 4%, durante 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução contendo sacarose 30% para crioproteção num período de 48 horas. O gânglio foi cortado à espessura de 14 μ m em criostato mantido à -30 °C e os cortes coletados em lâmina. As lâminas foram submetidas à metodologia de imuno-histoquímica de fluorescência para detecção de anticorpos monoclonais (mouse) específicos para: GFAP (astrócito – célula satélite) diluído a 1:1000 (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), e NGF: anti-NGF (F30, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) diluídos em PB contendo 0.3% Triton X-100 e 5% de soro normal de cabra (goat). As incubações com os anticorpos primários permaneceram overnight a uma temperatura de 24 °C.

Após a incubação os tecidos para imuno-histoquímica de fluorescência foram lavados três vezes de dez minutos em PB e incubado com tetrametil Rodamina Isotiocianato (TRICT) conjugado de pura afinidade Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch , USA) diluído 1:100 em PB por 2 horas a 24 °C. Após as lavagens em PB os cortes foram incubados com Neurotrace (500/525 verde fluorescente para marcação de Nissl) 1:500 durante 30 minutos para marcação de corpo neuronal. O controle dos experimentos consistiu na omissão do anticorpo primário e neste caso não foi observado marcação. Após as lavagens os tecidos foram montados em lâminas usando VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Foi feita a comparação entre ambos os grupos. A imunorreatividade foi analisada ao microscópio de fluorescência para detecção das imunomarcações. Não foi realizada análise quantitativa para este ensaio apenas observamos o aumento ou diminuição da imunorreatividade,

considerada assim, análise qualitativa. A análise quantitativa está baseada nos ensaios de *Western blot*.

2.7 Análise estatística

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

3 RESULTADOS

3.1 Envolvimento da Técnica de Mobilização Neural 14 dias após indução da dor neuropática.

3.1.1 Caracterização do modelo experimental - Injúria por constrição crônica (CCI)

Cabe mencionar, que os grupos experimentais descritos a seguir não passaram pelo tratamento com Mobilização Neural. Um grupo inicial foi realizado para padronizar a técnica de indução da neuropatia periférica e comparar com os grupos controle.

3.1.1.1 Avaliação da dor neuropática através da Hiperalgesia Mecânica

Os animais que não sofreram nenhum procedimento cirúrgico foram inicialmente submetidos ao teste comportamental para avaliação da resposta hiperalgésica para obtenção da medida inicial (MI). No décimo quarto dia (14d) após a lesão, todos os animais foram re-avaliados para verificação de possíveis alterações do limiar nociceptivo.

Observou-se uma diminuição do limiar nociceptivo do grupo experimental com constrição crônica do nervo isquiático no décimo quarto dia (CCI-14d) quando comparado com a medida inicial e com os grupos controle falso operado (FOP) e NAIVE. Esta diminuição se manteve no decorrer de todas as medidas comportamentais até a data de sacrifício (Figura 8). Cabe lembrar, que esta diminuição do limiar nociceptivo é o que caracteriza a resposta hiperalgésica.

As alterações observadas referem-se à diminuição do limiar nociceptivo ocasionado pela sensibilização decorrente da (CCI), demonstrando o efeito hiperalgésico após o procedimento cirúrgico. Cabe mencionar que observamos uma pequena diferença estatística entre os grupos controles (FOP) no décimo quarto dia após o procedimento cirúrgico em comparação com a medida inicial. Esta alteração provavelmente ocorreu devido à simulação do procedimento cirúrgico realizado no grupo FOP.

Figura 8 - Evolução do limiar nociceptivo após a cirurgia por meio da estimulação mecânica nociceptiva em ratos

O limiar de dor, avaliado pelo teste de Randall e Selitto e expresso em gramas, foi determinado antes (tempo zero - MI), no décimo quarto dia (14d) e em diversos tempos após a lesão. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com os grupos controles (FOP e NAIVE) e MI. ** $p < 0.05$ por comparação com a MI do mesmo grupo.

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

3.1.1.2 Através da Alodinia Mecânica

Em análise (figura 9), observou-se uma diminuição do limiar nociceptivo dos animais com (CCI) quando comparado com a MI e com grupos FOP e NAIVE. Ainda, observamos uma pequena queda no grupo FOP em comparação com a MI do mesmo grupo, esta alteração provavelmente se deve a manipulação da cirurgia.

As alterações observadas em relação ao grupo com constrição crônica do nervo isquiático referem-se à diminuição do limiar em resposta ao estímulo tátil, o que determina instalação do comportamento de alodinia, comum em neuropatias.

Figura 9 - Evolução do limiar nociceptivo após a cirurgia por meio da alodinia mecânica em ratos

O limiar de alodinia, avaliado pelo teste de Von Frey e expresso em gramas, foi determinado antes (tempo zero - MI), no décimo quarto dia (14 d) e em diversos tempos após a lesão. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com os grupos controle (FOP e NAIVE) e a MI. ** $p < 0.05$ por comparação com a MI do mesmo grupo.

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

3.1.1.3 Através da Hiperalgesia Térmica

Foi observada uma diminuição significativa do limiar térmico no grupo com constrição crônica do nervo isquiático a partir do décimo quarto dia (14d) com relação aos grupos controle, FOP e NAIVE (Figura 10). As alterações observadas referem-se à diminuição do limiar térmico ocasionado pela sensibilização central decorrente da cirurgia (CCI), demonstrando o efeito de hipersensibilidade térmica induzido pelo procedimento cirúrgico. Foi observado a mesma diferença estatística entre a medida inicial e a medida após 14 dias do grupo FOP, observada para os outros dois testes comportamentais demonstrado anteriormente.

Figura 10 - Evolução do limiar nociceptivo após a cirurgia por meio da hiperalgesia térmica em ratos

O limiar térmico, avaliado pelo teste de Hargreaves e expresso em segundos, foi determinado antes (tempo zero - MI), no décimo quarto dia (14 d) e em diversos tempos após a lesão. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação entre os grupos controle (FOP e NAIVE) e a MI. ** $p < 0.05$ por comparação com a MI do mesmo grupo.

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

3.1.2 Efeito da Mobilização Neural na dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático.

3.1.2.1 Avaliação da dor neuropática nos animais operados e tratados

O tratamento com a técnica de Mobilização Neural quando aplicado por dez minutos durante dez sessões, como descrito no material e método, foi capaz de reverter totalmente o efeito nociceptivo dos animais com dor neuropática.

Os animais com lesão do nervo isquiático e tratados com Mobilização (CCI MOB), quando submetidos aos modelos comportamentais de pressão da pata (Figura 11A) e alodinia mecânica (Figura 11B) demonstraram um aumento do limiar hiperalgésico e alodínico a partir da

segunda sessão quando comparados com o grupo sem tratamento (CCI). Este aumento do limiar nociceptivo manteve-se até a última sessão de Mobilização Neural (Figura 11 A,B).

De outro modo, quando este mesmo grupo de animais foi submetido ao teste de hiperalgesia térmica, o aumento do limiar foi observado somente a partir da quarta sessão de Mobilização Neural (Figura 11 C).

Com relação ao grupo controle, falso operado com mobilização (FOP MOB), este se manteve com limiar constante durante todo o tratamento, sem alterações significativas nos teste comportamentais (Figura 11).

As alterações observadas entre os grupos CCI x CCI MOB referem-se à melhora ocasionada pelo tratamento com a técnica de Mobilização Neural, demonstrando o efeito positivo da mesma contra a resposta nociceptiva decorrente da constrição crônica do nervo isquiático. Cabe mencionar que foi feito o grupo operado sem tratamento, porém submetido ao anestésico inalatório (CCI-Halotano). Não foi possível observar uma melhora da nocicepção nos testes comportamentais realizados com os animais do grupo CCI-Halotano, ou seja, o Halotano não interfere na resposta nociceptiva, como observada no grupo CCI MOB (resultado não demonstrado).

Figura 11 - Evolução do limiar nociceptivo após a cirurgia e tratamento com a técnica de Mobilização Neural em ratos.

A) Hiperalgesia Mecânica

B) Alodinia Mecânica

C) Hiperálgia Térmica

Alterações no limiar nociceptivo foram avaliadas pelo teste de Randall e Selitto (A), pelo teste de Von Frey (B), ambos expressos em gramas e pelo teste de Hargreaves (C), expresso em segundos. O limiar nociceptivo foi determinado antes (tempo zero - MI), no décimo quarto dia (14d) e em diversos dias após as intervenções terapêuticas. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 10 animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação entre o grupo CCI e CCI MOB.

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

3.1.3 Efeitos da Mobilização Neural nos parâmetros celulares por meio de ensaios de Western Blot

3.1.3.1 Efeitos sobre o Fator de Crescimento Neural (NGF)

Ensaio de *Western Blot* confirmaram que o anticorpo utilizado neste estudo reconhece uma única banda em torno de 27 kDa. Foram feitas comparações entre os grupos experimentais (CCI e CCI MOB) contra os grupos controle (FOP e NAIVE) para determinar a síntese do Fator de Crescimento Neural (NGF) no nervo isquiático, no gânglio da raiz posterior (segmento de L4-L6) e na porção lombossacral da medula espinal.

3.1.3.1.1 Nervo isquiático

No nervo isquiático, foi observado um aumento de 72% da densidade óptica das bandas marcadas com NGF no grupo CCI quando comparado com o grupo controle (NAIVE). Porém, após o tratamento com Mobilização Neural, o grupo CCI MOB teve um aumento de 124%, quando comparado com o grupo controle (NAIVE). Encontramos uma diferença de 52% a menos no grupo CCI quando comparado com o grupo CCI MOB. (Figura 12). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo (n=10). Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Figura 12 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na síntese do fator de crescimento neural (NGF) no nervo isquiático de

ratos

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

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

3.1.3.1.2 No gânglio da raiz posterior (DRG) - segmento L4- L6

No DRG, observamos um aumento de 111% da densidade óptica das bandas marcadas com NGF no grupo CCI quando comparado com o grupo controle (NAIVE). O grupo CCI MOB teve uma diminuição do NGF imunorreativo ao nível basal quando comparado com os animais controle (FOP e NAIVE) (Figura 13). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo (n=10).

Figura 13 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na síntese do NGF no gânglio da raiz posterior de ratos

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

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

3.1.3.1.3 Medula espinal

Na medula espinal, não observamos uma diferença da densidade óptica das bandas marcadas com NGF, quando comparamos o grupo CCI MOB, CCI e grupos controle (FOP e NAIVE) (Figura 14). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo (n=10). Nenhuma diferença foi observada para β-actina entre os grupos analisados.

Figura 14 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na síntese do fator de crescimento neural (NGF) na medula espinal de ratos

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

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

3.1.3.2 Efeitos sobre a proteína acídica fibrilar (GFAP) no gânglio da raiz posterior (DRG)

Ensaio de *Western Blot* confirmaram que o anticorpo utilizado neste estudo reconhece uma única banda em torno de 50 kDa. Foram feitas comparações entre os grupos experimentais (CCI e CCI MOB) contra os grupos controle (FOP e NAIVE) para determinar a síntese da proteína acídica fibrilar (GFAP) no gânglio da raiz posterior (segmento de L4-L6).

3.1.3.2.1 No gânglio da raiz posterior (DRG) - segmento de L4-L6

No DRG foi observado um aumento de 68% da densidade óptica das bandas marcadas com GFAP no grupo CCI quando comparado com o grupo controle (NAIVE). O grupo CCI MOB teve uma diminuição do GFAP imunorreativo ao nível basal quando comparado com os animais controle (FOP e NAIVE) (Figura 15). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo (n=10).

Figura 15 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na atividade da proteína ácida fibrilar (GFAP) no gânglio da raiz posterior de ratos.

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

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

3.1.3.3 Efeito sobre a Proteína Zero (PO) do nervo isquiático

Ensaio de *Western Blot* confirmaram que o anticorpo utilizado neste estudo reconhece uma única banda em torno de 25 kDa. Uma vez que foram feitas comparações entre os animais experimentais (CCI MOB e CCI) contra os grupos controle (FOP e NAIVE) para determinar a síntese da Proteína Zero (PO) do nervo isquiático de ratos.

3.1.3.3.1 Nervo isquiático

No nervo isquiático, foi observado um aumento da densidade óptica das bandas marcadas com PO no grupo CCI e CCI MOB. O grupo CCI MOB teve um aumento de 207%, e o grupo CCI 115%, quando comparado com o grupo-controle (NAIVE) (Figura 16). Os resultados estão representados em gráficos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de dez animais por grupo ($n=10$).

Figura 16 - Efeito da Técnica de Mobilização Neural na síntese da Proteína Zero (PO) no nervo isquiático de ratos

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

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

3.1.4 Efeitos da Mobilização Neural nos parâmetros celulares por meio de ensaios de imunohistoquímica de fluorescência

3.1.4.1 Ilustração e demonstração do efeito sobre o Fator de Crescimento Neural (NGF) no gânglio da raiz posterior (segmento L4) de ratos com dor neuropática crônica tratados com Mobilização Neural

Nós ilustramos e demonstramos a expressão de NGF no gânglio da raiz posterior (DRG) do segmento de L4, ipsilateral a lesão, dos grupos experimentais (CCI MOB e CCI) e controle (NAIVE e FOP). Ressaltamos que o gânglio de L4 recebe informações sensoriais proveniente do nervo isquiático. Durante a análise, observamos uma discreta marcação de NGF imunorreativo (NGF-IR) no gânglio de L4 dos animais controle (NAIVE e FOP) (Figura 17).

Os animais com CCI apresentaram um aumento de marcação de NGF-IR (Figura 17) quando comparado com os grupos controle. No entanto, o grupo CCI MOB apresentou

diminuição do NGF-IR na estrutura estudada (Figura 17), o mesmo observado no resultado com a técnica de *Western Blot*

O NGF-IR foi colocalizado por meio dupla marcação com marcador específico de neurônio (neurotrace) (NT) para melhor localizar as marcadas com NGF no gânglio de L4.

Figura 17 - A Imuno-histoquímica de fluorescência ilustra a expressão de NGF no DRG (segmento - L4)

Foram utilizados grupos controle (Naive e Fop) e grupo experimental CCI (lesão) e CCI MOB (com tratamento de mobilização neural). Observe-se que a expressão do NGF após Mobilização Neural (grupo CCI MOB) diminuiu quando comparada com o grupo CCI. Barra da escala, 50 μ m, objetiva 20x.

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

3.1.4.2 Ilustração e demonstração do efeito da proteína acídica fibrilar (GFAP) no gânglio da raiz posterior (segmento - L4) de ratos com dor neuropática crônica tratados com Mobilização Neural

Nós ilustramos e demonstramos a expressão da proteína acídica fibrilar (GFAP) no gânglio da raiz posterior (DRG) do segmento de L4, ipsilateral à lesão, dos grupos experimentais

Resultados

(CCI MOB e CCI) e controle (NAIVE e FOP). Durante a análise, observamos uma marcação basal de GFAP imunorreativo (GFAP-IR) no gânglio de L4 dos animais controle (NAIVE e FOP) (Figura 18).

Os animais com CCI apresentaram um aumento de marcação de GFAP-IR (Figura 18) quando comparado com os grupos controle. No entanto, o grupo CCI MOB apresentou diminuição do GFAP-IR na estrutura estudada (Figura 18). O GFAP-IR foi colocalizado por meio de dupla marcação com o marcador específico de neurônio (neurotrace) (NT), a fim de demonstrar a sua afinidade exclusiva por células satélites (glia) no gânglio de L4.

Figura 18 - Imuno-histoquímica de fluorescência ilustra a expressão de GFAP no DRG (Segmento L4)

Foram utilizados grupos controle (Naive e Fop) e grupo experimental CCI (lesão) e CCI MOB (com tratamento de Mobilização Neural). Observe que a expressão do GFAP após a Mobilização Neural diminuiu em comparação com o grupo CCI. Barra da escala, 100 μ m, objetiva 20x.

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

3.1.4.3 Ilustração e demonstração do efeito da dupla marcação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) com o Fator de Crescimento Neural (NGF) no gânglio da raiz posterior (segmento - L4) de ratos com dor neuropática crônica tratada com Mobilização Neural

Nós ilustramos e demonstramos a dupla marcação da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) com o Fator de Crescimento Neural (NGF) no gânglio da raiz posterior (DRG) do segmento de L4, ipsilateral à lesão, dos grupos experimentais (CCI MOB e CCI) e controle, (NAIVE e FOP) para demonstrar se a liberação de NGF poderia ser liberada pelas células satélites do DRG. Observamos uma marcação basal de GFAP e NGF imunorreativo (GFAP-IR e NGF-IR) no gânglio de L4 dos animais controle (NAIVE e FOP) (Figura 19).

Os animais com CCI apresentaram um aumento de marcação de GFAP-IR e NGF-IR (Figura 19) quando comparado com os grupos controle. No entanto, o grupo CCI MOB apresentou diminuição do GFAP-IR e NGF-IR na estrutura estudada (Figura 19). Na última coluna da mesma figura, podemos observar a colocalização do GFAP e NGF. Após a CCI existe um aumento de ambos marcadores e com o tratamento com a Mobilização Neural, a colocalização diminui.

Figura 19 - Imuno-histoquímica de fluorescência ilustra a expressão de GFAP e NGF no DRG (Segmento L4).

Foram utilizados grupos controle (Naive e Fop) e grupo experimental CCI (lesão) e CCI MOB (com tratamento de Mobilização Neural). Observe que a expressão de GFAP está colocalizada com o NGF por meio de dupla marcação. Barra da escala, 100 μ m, objetiva 20x.

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

4 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da Mobilização Neural no controle da dor neuropática e nos efeitos da dor em compressões do nervo isquiático de rato.

Os modelos escolhidos no presente projeto de pesquisa, para avaliar os efeitos da Mobilização Neural sobre a dor neuropática foram: o de lesão constritiva crônica que consiste de quatro amarraduras frouxas ao redor do nervo isquiático (Bennett e Xie, 1988) e a técnica de Mobilização Neural (Butler, 1991) adaptada no laboratório de Neuroanatomia funcional da dor para pesquisa básica, a fim de esclarecer os fenômenos que ocorrem durante a dor neuropática que é de difícil tratamento.

Inicialmente padronizamos o modelo de CCI em ratos, onde induzimos a lesão, como descrito na metodologia, e no décimo quarto dia (14d) pós-lesão os animais estavam com o quadro neuropático instalado, ou seja, apresentavam um quadro hiperalgésico, permitindo a padronização do modelo. Estas observações estão baseadas nos resultados obtidos até o momento no presente projeto de pesquisa e descritas a seguir.

4.1 Efeitos sobre os testes comportamentais

Com relação aos testes comportamentais, avaliamos a resposta da hiperalgesia térmica, mecânica e alodínica dos animais após constrição crônica do nervo isquiático de ratos. Nossos resultados sugerem uma diminuição do limiar nociceptivo após o décimo quarto dia da lesão, quando comparadas às medidas iniciais (MI) entre os grupos, demonstrando assim o bom funcionamento do modelo experimental. Nossos achados corroboram com os dados apresentados por Bennett e Xie (1988), que descreveram inicialmente este modelo, bem como, corroboram também, com os trabalhos que demonstram que a injúria do nervo periférico resulta em dor neuropática persistente ou crônica, caracterizada por dor espontânea em queimação acompanhada de alodinia e hiperalgesia (Payne e Norfleet, 1986).

Com a finalidade de induzir a analgesia e promover uma melhora da resposta hiperalgésica nós adaptamos e padronizamos a técnica de Mobilização Neural para o tratamento das alterações decorrentes do nosso modelo experimental de dor neuropática. A técnica de Mobilização Neural demonstrou-se ser efetiva no combate da hiperalgesia térmica, mecânica e alodínica dos animais com constrição do nervo isquiático. Estas observações estão baseadas nos

resultados comportamentais que observamos ao avaliarmos os grupos experimentais a partir do 14º dia até a última sessão de Mobilização Neural, o equivalente a 20 dias.

Nossos resultados demonstram uma reversão parcial do quadro nociceptivo (hiperalgesia mecânica e alodínica) dos animais a partir da segunda sessão de Mobilização Neural. Por outro lado, o limiar térmico, quando avaliado por meio do teste de hiperalgesia térmica, foi revertido a partir da quarta sessão de Mobilização Neural. A diferença observada entre os testes comportamentais para a hiperalgesia térmica, mecânica e alodinia pode ser melhor explicado devido as diferenças entre os tipos de fibras do tipo; A β , A δ e C, por apresentarem diferenças no diâmetro, na mielinização, na velocidade de condução do impulso elétrico e na regeneração da fibras que conduzem as informações térmicas e nociceptivas (Willis e Coggeshall, 2004).

As captações de informações nociceptivas ocorrem por meio de ativação de terminações nervosas livres denominadas nociceptores. A dor nociceptiva ocorre como resultado da ativação destes receptores, que, por serem livres, se localizam-se em diversos tecidos que constituem o organismo. Os receptores sensoriais, preferencialmente sensíveis a estímulos nocivos ou potencialmente nocivos, encontram-se na pele, músculo, tecidos conjuntivos e vísceras. Estas unidades têm aparência morfológica bem evidente à microscopia de luz e eletrônica e, fisiologicamente, caracterizam-se pelos seus padrões de reação a estímulos cutâneos, mecânicos, térmicos e químicos. Uma vez ativados, os nociceptores conduzem impulsos por meio de fibras aferentes mielínicas, ou por fibras não mielínicas. Estudos fisiológicos têm demonstrado que os nociceptores não são ativos espontaneamente, mas podem ser sensibilizados, particularmente após o dano tecidual (Dray, 1994). A sensibilização manifesta-se como uma diminuição do limiar nociceptivo de ativação após o dano tecidual e intensidade aumentada da reação a um dano prejudicial. Em muitas condições, a lesão tecidual representa a causa imediata da dor. Como mencionado, 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 térmica, mecânica e alodinia (Dray, 1995, 1997).

A fibra A β possui um diâmetro inferior a 10 μ m e é constituída por muitas células de Schwann que são responsáveis pela mielinização. Por este motivo, as fibras A β possuem tempo de condução de 30-100 m/s. As fibras A δ propagam as informação com velocidade aproximada de 12-30 m/s, ou seja, inferior a fibras A β , além de terem diâmetro inferior a 6 μ m e quantidades

reduzidas de células produtoras de bainha de mielina. De outro modo, as fibras do tipo C possuem menor diâmetro, ausência de mielina e tempo de condução entre 0,5-2 m/s. São as fibras mais abundantes do corpo, cerca de 70%, quando comparadas com 20% das fibras A β e 10% das fibras A δ (Willis e Coggeshall, 2004).

Outro aspecto a ser levado em consideração para as diferenças observadas entre os testes comportamentais é o fato de alguns subgrupos de fibras do tipo A δ conduzirem predominantemente estímulos térmicos (Treede, Meyer e Campbell, 1998) e possuírem bainha de mielina, fator que reduz o tempo de regeneração nervosa quando comparado com as fibras do tipo C (Lent, 2004), desprovidas de bainha de mielina, justificando assim acréscimo de duas sessões de Mobilização Neural para reverter a hiperalgesia térmica. Outros estudos demonstram a participação de canal iônico de TRPV1 no desenvolvimento da hiperalgesia térmica após a inflamação (Belmonte e Viana, 2008; Koerber et al., 2010). Além disso, nossos achados corroboram com outros estudos de terapia manual, inclusive estudo sobre mobilização articular, em que os autores obtiveram melhora da hiperalgesia térmica tardiamente. Neste estudo, os autores mencionam a participação de neuromediadores distintos para cada tipo de hiperalgesia, sendo, na térmica, a participação serotoninérgica e na mecânica, noradrenérgica (Lovick, 1991; Martins et al., 2011; Vincenzino et al., 1995). Nesse sentido, acreditamos que a técnica de Mobilização Neural talvez possa estimular seletivamente uma ativação específica do sistema inibitório descendente da dor endógena agindo sobre receptores específicos.

Ainda, foi questionado se o anestésico inalatório poderia estar interferindo em nossos resultados comportamentais. Portanto, adicionado um grupo CCI-Halotano (conforme descrito na metodologia). Neste grupo, não foi possível observar diferença nos testes comportamentais entre os grupos CCI e CCI-Halotano, corroborando, portanto, com outros autores que ressaltam que o halotano não interfere nas respostas comportamentais, desde que os testes sejam realizados somente após 24 horas da sedação (Goto, Marota e Crosby, 1994). Nesse sentido, outros estudos demonstram que o anestésico inalatório (Halotano) foi capaz de diminuir a resposta nociceptiva (retornando a níveis basais) mais rapidamente do que outros anestésicos inalatórios como, enflurano, isoflurano e desflurano. Sugerindo, por tanto que estes anestésicos não influenciam no modelo de sensibilização crônica (Goto, Marota e Crosby, 1994; Martins et al., 2011; O'Connor e Abram, 1995). Vale lembrar que todos os testes comportamentais foram realizados em dias

intercalados como descrito no material e método, completando um período de 24 horas entre um teste e outro, como sugerido por toda a literatura recente.

Na literatura existente, como já mencionado, encontramos diversos estudos indicando que a técnica de Mobilização Neural é eficiente clinicamente (Dwornik et al., 2009; Sweeney e Harms, 1996; Walsh, 2005). No entanto, essa literatura é escassa quando pesquisamos sobre as mudanças teciduais e moleculares que estão envolvidas com a aplicação da técnica de Mobilização Neural, sendo questionado, também, a evidência clínica dos estudos quanto a qualidade metodológica e falta de estudos randomizados (Ellis e Hing, 2008).

4.2 Efeitos sobre parâmetros celulares

Com o sucesso da padronização e da adaptação da técnica de Mobilização Neural para uso em pesquisa básica com ratos, passamos a estudar as alterações morfológicas no nervo isquiático, na medula espinal e no gânglio da raiz posterior (DRG) dos animais com constrição crônica do nervo isquiático (CCI) que foram submetidos ao tratamento dessa técnica. Observamos por meio da técnica de *Western Blot*, um aumento do fator de crescimento neural (NGF) e Proteína Zero (PO) no nervo isquiático dos animais que compunham o grupo com constrição crônica do nervo isquiático tratados com Mobilização Neural quando comparados com os animais CCI e controle (NAIVE e FOP).

Nossos achados corroboram, até certo ponto, com a pesquisa realizada por Martins et al., (2009) os quais demonstraram as mudanças comportamentais e morfológicas em ratos com a aplicação da técnica de Mobilização Neural (Martins, 2009). Este grupo utilizou como modelo experimental a lesão traumática do nervo isquiático, a qual foi realizada com o auxílio de uma pinça hemostática não serrilhada que comprimia o nervo isquiático por 30 segundos acima da trifurcação. Os animais foram tratados com Mobilização Neural precocemente (a partir do primeiro dia pós lesão) e tardiamente (a partir do quinto dia pós lesão), sendo observado uma melhora na parte comportamental (alodinia) e na locomoção dos animais, além de alterações morfológicas como, por exemplo, aumento do RNAm para a proteína zero (PO) no nervo isquiático. No entanto, sabe-se que toda lesão de nervo periférico do tipo axonotmese responde fisiologicamente a regeneração tecidual conforme já descrito na literatura (Lent, 2004). Ainda, demonstramos um aumento do NGF no nervo isquiático dos animais tratados, o qual favorece a regeneração, a sobrevivência e o crescimento neural como já descrito anteriormente por Levi-

Montalcini em 1987 (Levi-Montalcini, 1987). Concluindo, portanto, que a técnica de Mobilização Neural favorece estes mecanismos, bem como a melhora da nocicepção.

O NGF, como já mencionado, desempenha um papel muito importante sobre a sobrevivência, diferenciação e crescimento neural; esse neuropeptídeo é produzido e liberado pelos tecidos alvos sendo absorvido para manter a sobrevivência neuronal (Bear, Connors e Paradiso, 2002; Pezet e McMahon, 2006).

O aumento do NGF no nervo isquiático está relacionada com a regeneração e crescimento neural, corroborando com os resultados descritos por Sun et al., (2008) e Silva et al., (1989). O primeiro grupo de pesquisadores demonstrou que a injeção intravitreal de NGF exógeno promove proteção da retina deslocada por prevenir apoptose celular após o deslocamento (Sun et al., 2008). O segundo grupo de pesquisadores seccionou o nervo isquiático e suturaram esse nervo num tubo de polietileno, em seguida aplicou-se colágeno e/ou NGF, seis semanas após sua aplicação, as células do gânglio da raiz posterior foram preenchidas retrogradamente com peroxidase, demonstrando que a adição de NGF pode aumentar a taxa de regeneração (Silva e Langone, 1989). Baseados em nossos resultados e nos dados descritos na literatura, acreditamos que a técnica de Mobilização Neural induz aumento do NGF no nervo isquiático, favorecendo a regeneração e o crescimento neural.

Sobre os estudos da medula espinal, acreditávamos inicialmente que a técnica de Mobilização Neural adaptada por nós poderia exercer um impacto sobre as neurotrofinas presentes na medula espinal como, por exemplo, NT-3, BDNF e NGF. Uma vez que, Lew e Briggs, 1997, sugeriram que os movimentos de flexão cervical e flexão do quadril influenciam diretamente na medula espinal (Lew e Briggs, 1997), justifica-se o nosso interesse em entender melhor o papel do NGF nos ratos com dor neuropática submetidos ao tratamento com Mobilização que faz uso destes movimentos, conforme descrito e ilustrado na metodologia deste trabalho.

Os nossos resultados sobre os ensaios de *Western Blot* não revelaram alterações significantes para o NGF na medula espinal dos animais que compunham o grupo com CCI tratados com Mobilização Neural quando comparados com os animais CCI e controle (NAIVE e FOP) apesar dos inúmeros trabalhos demonstrando a participação das neurotrofinas como NT-3, BDNF e o NGF na medula espinal (Li et al., 2007; Yara et al., 2009) bem como o efeito neuroprotetor do NGF em neurônios da medula espinal intoxicados por glutamato (Huang et al.,

2009) ou ainda o papel do NGF como um sinalizador da dor por melhorar a hiperalgesia provocada pela dor neuropática quando o NGF é bloqueado (Ro et al., 1999).

Uma possível sugestão da ausência de participação do NGF na medula espinal de ratos com dor neuropática e tratados com Mobilização Neural é devida à existência de neurônios pseudounipolares nos gânglios espinais. A localização topográfica dos neurônios de terceira e quarta ordem estão localizados no tálamo (Moore, Dalley e de Araújo, 2007; Schünke, 2006), local em que vem sendo estudado no laboratório de neuroanatomia funcional da dor e já se tem observado aumento do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e de astrócitos (marcado por GFAP) e a diminuição desse fator com o tratamento da Mobilização Neural (Giardini et al., 2011).

O aumento do NGF periférico no nervo isquiático dos animais que compunham grupo CCI MOB, quando comparado com os grupos CCI e controle NAIVE e FOP despertou a nossa atenção quando observamos uma melhora nos testes comportamentais, divergindo desta forma dos achados de Woolf et al., (1994) e McMhon et al., (1995), que sugerem que o aumento do NGF periférico está associado a dor, fato este que nos levou a estudar o NGF e a atividade das células da satélites (glia - astrócito) no gânglio da raiz posterior, por serem células de sustentação neuronal, além de armazenar e expressar NGF em situações de injúrias (Sorkin e Schafer, 2007).

No DRG, utilizamos a técnica de imuno-histoquímica de fluorescência para ilustração e demonstração no segmento de L4, e a técnica de *Western Blot* para quantificação dos resultados, dos segmentos de L4-L6. Observamos um aumento do NGF no grupo com CCI e uma diminuição da imunorreatividade para o NGF nos animais que compunham o grupo com CCI tratados com Mobilização Neural, quando equiparados com os grupos controle (NAIVE e FOP). Isso indica que o aumento do NGF no gânglio está associado ao comportamento de hiperalgesia observado nos testes comportamentais dos animais com CCI. Nossos dados estão de acordo com diversos estudos que demonstram o fato de que a injeção de NGF por via sistêmica ou periférica induz a hiperalgesia (Hanani, 2005; Pannese e Procacci, 2002; Ro et al., 1999; Zhou et al., 1999). De fato, o NGF parece ser um mediador crítico para todos os tipos de dor, incluindo dor aguda (McMahon et al., 1995), dor pós operatória (Banik et al., 2005), dor inflamatória (Woolf, 2004) e dor neuropática (Watson, Allen e Dawbarn, 2008).

A dor induzida por inflamação periférica ou por neuropatia está sendo associada ao envolvimento das células gliais ou células satélites, assim chamadas, no DRG, por serem capazes

de liberar mediadores da inflamação que sensibilizam a via de dor (Fellin e Carmignoto, 2004; Watkins e Maier, 2003). Neste sentido, analisamos a participação do GFAP no DRG em animais com lesão e tratados com Mobilização Neural. Nossos resultados demonstram também um aumento do GFAP no grupo operado e uma diminuição a níveis basais no grupo tratado com Mobilização Neural. Nossos achados corroboram com estudos, em que sugerem que a lesão do nervo leva a uma proliferação e hipertrofia das células satélites e outras moléculas, incluindo neurotrofinas, fator de necrose tumoral- α e junções gaps (Hanani, 2005; Xie, Strong e Zhang, 2009). Além disso, surgiu a curiosidade de saber se o NGF observado está sendo produzido ou liberado pelas células gliais já observada em nosso modelo. Para tanto, fizemos uma dupla marcação entre NGF e GFAP para ilustrar tal evento. Assim, observamos uma colocalização entre as células gliais e NGF, sugerindo que no nosso modelo o NGF presente no DRG pode estar sendo liberado pelas células satélites do DRG. A diminuição das células da glia no DRG, consequentemente, leva a uma menor liberação de mediadores nociceptivos, justificando a melhora observada nos testes comportamentais para hiperalgesia mecânica, alodinia e térmica, corroborando com o estudo de Ohara et al.,(2009) (Ohara et al., 2009).

A melhora nos ensaios comportamentais provavelmente está associada aos gânglios espinais (DRG), que são estruturas arredondadas devido à existência de corpos de neurônios pseudounipolares que são aqueles que apresentam um prolongamento central e outro periférico. Como já mencionado na introdução, toda informação proveniente da periferia como, por exemplo, estímulos de tato, pressão, temperatura e dor passam por meio destes aos gânglios espinais antes de seguirem para a medula espinal, local em que farão sinapses com outros neurônios (Moore, Dalley e de Araújo, 2007; Schünke, 2006).

Nossos resultados corroboram em partes, com os estudos de Fukui et al., (2010), os quais bloquearam o receptor p75 para NGF no DRG (segmento L5) e observaram uma melhora da alodinia mecânica no animais com CCI, comprovando o envolvimento da célula satélite com o armazenamento de NGF (Fukui et al., 2010), por terem receptores para este neuropeptídeo (p75 e Trka) (Pannese, 1981), e com a liberação de NGF na rede glia-neural. Fator que sugere a participação do NGF do DRG com a dor neuropática (McMahon et al., 1995; Woolf et al., 1994).

Outro fator importante que contribuiu para a melhora observada por nós nos testes comportamentais dos animais com CCI tratados com MOB foi o de que as células satélites do

DRG, liberam mediadores nociceptivos e, por isso possuem papel relevante na transmissão da informação nociceptiva para o sistema nervoso central (Abad et al., 2008; Milligan et al., 2003; Watkins e Maier, 2003). Essas células sintetizam várias substâncias, muitas das quais são também liberadas por neurônios nociceptivos. Maiores estudos utilizando a técnica de Mobilização Neural devem ser realizados para uma melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvidos no modelo de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático (CCI).

Em síntese a técnica de Mobilização Neural reverteu os comportamentos de hiperalgesia mecânica, térmica e alodínia, bem como, aumento o NFG e a PO no nervo isquiático, diminuiu NGF e GFAP no gânglio da raiz posterior e na medula espinal a técnica não apresentou alterações estatísticas.

5 CONCLUSÃO

O tratamento com Mobilização Neural foi capaz de bloquear, a partir da segunda sessão, a resposta hiperálgica e a alodínica induzida pela lesão crônica no nervo isquiático. Todavia, a hiperálgia térmica foi bloqueada a partir da quarta sessão de MOB. Observamos aumento da densidade óptica para o NGF e proteína zero no nervo isquiático após tratamento com MOB porém, não observamos mudança estatística para o NGF quando analisamos a medula espinal dos animais. No DRG, identificamos uma diminuição do NGF e GFAP após tratamento com MOB, quando comparado com o grupo CCI. Portanto, acreditamos que a MOB diminui os sintomas da dor neuropática induzida pela CCI do nervo isquiático por diminuir o NGF e o GFAP no DRG, além de favorecer a regeneração do nervo isquiático devido ao aumento local de NGF e Proteína zero.

REFERÊNCIAS

Abad MC, Askari H, O'Neill J, Klinger AL, Milligan C, Lewandowski F, Springer B, Spurlino J, Rentzeperis D. Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;108(1-2):44-54.

Adel SM. Efficacy of Neural Mobilization in Treatment of Low Back Dysfunctions. *Journal of American Science*. 2011;7(4):566-73.

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.

Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009;457(7230):675-7.

Apfel SC. Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold? *Int Rev Neurobiol*. 2002;50:393-413.

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:795-813.

Backonja MM. Defining neuropathic pain. *Anesth Analg*. 2003;97(3):785-90.

Banik RK, Subieta AR, Wu C, Brennan TJ. Increased nerve growth factor after rat plantar incision contributes to guarding behavior and heat hyperalgesia. *Pain*. 2005;117(1-2):68-76.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain*. 1991;47(3):359-67.

Bear FM, Connors WB, Paradiso AM. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. Porto Alegre: Artmed; 2002. p.855.

Belmonte C, Viana F. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Molecular pain*. 2008;4(1):14.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.

Bertolini GRF, Silva TS, Trindade DL, Ciena AP, Carvalho AR. Neural mobilization and static stretching in an experimental sciatica model: an experimental study. *Rev Bras Fisioterapia*. 2009;13(6):493-8.

Bessa IM. Testes Neurodinâmicos do Membro Superior. *EssFisioONLINE*. 2004.1(1):20-30.

Bialosky JE, Bishop MD, Price DD, Robinson ME, Vincent KR, George SZ. A randomized sham-controlled trial of a neurodynamic technique in the treatment of carpal tunnel syndrome. *Orthop sports phys*. 2009;39(10):709.

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.

Briani C, Adami F, Cavallaro T, Taioli F, Ferrari S, Fabrizi G. Axonal neuropathy due to myelin protein zero mutation misdiagnosed as amyloid neuropathy. *Muscle Nerve*. 2008;38(1):921-3.

Butler DS. *Mobilisation of the Nervous System*. Singapore: Churchill Livingstone. 1991; p.30.

Chacur M, Gutierrez JM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Britto LR, Maier SF, Watkins LR, Cury Y. Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators. *Pain*. 2004a;111(1-2):65-76.

Chacur M, Milligan ED, Sloan EM, Wieseler-Frank J, Barrientos RM, Martin D, Poole S, Lomonte B, Gutierrez JM, Maier SF, Cury Y, Watkins LR. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain*. 2004b;108(1-2):180-91.

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(4):299-309.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci Methods*. 1994;53:55-63.

Chavez DC. Efectos de la células de Schwann en la regeneración de tejido nervioso / Effects of the Schwann cells in the nerve tissue regeneration. *Rev cient*. 1997;1:65-8.

Cirillo G, Cavaliere C, Bianco MR, De Simone A, Colangelo AM, Sellitti S, Alberghina L, Papa M. Intrathecal NGF administration reduces reactive astrogliosis and changes neurotrophin receptors expression pattern in a rat model of neuropathic pain. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(1):51-62.

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.

Devor M. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Text Book of Pain*. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1994. p.79-100.

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

Dray A. Tasting the inflammatory soup: role of peripheral neurones. *Pain Rev*. 1994;1:153-71.

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.
- Ekstrom RA, Holden K. Examination of and intervention for a patient with chronic lateral elbow pain with signs of nerve entrapment. *Physical therapy.* 2002;82(11):1077.
- Ellis R, Hing W, Dilley A, McNair P. Reliability of measuring sciatic and tibial nerve movement with diagnostic ultrasound during a neural mobilisation technique. *Ultrasound in medicine & biology.* 2008;34(8):1209-16.
- 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.
- Fellin T, Carmignoto G. Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol.* 2004;559(Pt 1):3-15.
- Fox IS. *Fisiologia Humana.* São Paulo: Manole; 2007. p.100-105.
- Fukui Y, Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Orita S, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Wakai K, Hayashi Y, Aoki Y, Takahashi K. Low affinity NGF receptor (p75 neurotrophin receptor) inhibitory antibody reduces pain behavior and CGRP expression in DRG in the mouse sciatic nerve crush model. *J Orthop Res.* 2010;28(3):279-83.
- 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.
- Giardini AC, Santos FM, Silva JT, Chacur M. Neural Mobilization for neurophatic pain control: Evaluation of glial cells and brain-derived neurotrophic factor. In: *Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia experimental*; 2011; Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Sociedade de Biologia experimental. 2011; p.80.

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.

Gross AR, Hoving JL, Haines TA, Goldsmith CH, Kay T, Aker P, Bronfort G. A Cochrane review of manipulation and mobilization for mechanical neck disorders. *Spine*. 2004;29(14):1541.

Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain res rev*. 2005;48(3):457-76.

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.

Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(3):185-93.

Heebner ML, Roddey TS. The effects of neural mobilization in addition to standard care in persons with carpal tunnel syndrome from a community hospital. *J. Hand Ther*. 2008;21(3):229-41.

Herzberg U, Eliav E, Dorsey JM, Gracely RH, Kopin IJ. NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Neuroreport*. 1997;8(7):1613-8.

Huang F, Dong X, Zhang L, Zhang X, Zhao D, Bai X, Li Z. The neuroprotective effects of NGF combined with GM1 on injured spinal cord neurons in vitro. *Brain res bull*. 2009;79(1):85-8.

Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(2):83-91.

Jang SW, Svaren J. Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. *J Biol Chem*. 2009;284(30):20111-20.

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

Kimelberg HK. Primary astrocyte cultures--a key to astrocyte function. *Cell Mol Neurobiol*. 1983;3(1):1-16.

Koerber HR, McIlwrath SL, Lawson JJ, Malin SA, Anderson CE, Jankowski MP, Davis BM. Cutaneous C-polymodal fibers lacking TRPV1 are sensitized to heat following inflammation, but fail to drive heat hyperalgesia in the absence of TPV1 containing C-heat fibers. *Mol pain*. 2010;6(1):58.

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.

Lent R. Cem Bilhões de Neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. Porto Alegre: Artmed. 2004; p.698.

Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 1987;237:1154-62.

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.

Li XL, Zhang W, Zhou X, Wang XY, Zhang HT, Qin DX, Zhang H, Li Q, Li M, Wang TH. Temporal changes in the expression of some neurotrophins in spinal cord transected adult rats. *Neuropeptides*. 2007;41(3):135-43.

Liu F, Wang T, Li M, Wu L, Feng Z. Expression of NGF, BDNF and NT-3 in satellite cells of dorsal root ganglion. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2003;34(1):36-9.

Lovick T. Interactions between descending pathways from the dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the rat. *Mid Periaq Gray Matter*. New York: Plenum; 1991. p.120.

Maricar N, Shacklady C, McLoughlin L. Effect of Maitland mobilization and exercises for the treatment of shoulder adhesive capsulitis: a single-case design. *Physiother Theory Pract*. 2009;25(3):203-17.

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, Martins LM, Gadotti VM, Nascimento FP, Lima DAN, Speckhann B, Favretto GA, Bobinski F, Ferreira EC, Bressan E, Dutra RC, Calixto JB, Santos ARS. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. *PAIN*. 2011; in press, doi: 10.1016/j.pain.2011.08.014.

Martins FD. Mobilização neural como recurso terapêutico na recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos após lesão traumática [dissertação (mestrado em Neurociências)]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

McMahon SB, Bennett DL, Priestley JV, Shelton DL. The biological effects of endogenous nerve growth factor on adult sensory neurons revealed by a trkA-IgG fusion molecule. *Nat Med*. 1995;1(8):774-80.

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. *J Neurosci*. 2003;23(3):1026-40.

Moore KL, Dalley AF, de Araújo CLC. In: Anatomia do dorso. Anatomia orientada para a clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p.180-5.

Moss P, Sluka K, Wright A. The initial effects of knee joint mobilization on osteoarthritic hyperalgesia. *Manual Ther*. 2007;12(2):109-18.

Muller M, Tsui D, Schnurr R, Biddulph-Deisroth L, Hard J, MacDermid JC. Effectiveness of hand therapy interventions in primary management of carpal tunnel syndrome: a systematic review* 1. *J Hand Ther*. 2004;17(2):210-28.

O'Connor TC, Abram SE. Inhibition of nociception-induced spinal sensitization by anesthetic agents. *Anesthesiology*. 1995;82(1):259-66.

Ohara PT, Vit JP, Bhargava A, Romero M, Sundberg C, Charles AC, Jasmin L. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist*. 2009;15(5):450-63.

Oskay D, Meri AI, Kirdi N, Firat T, Ayhan, Leblebicioglu G. Neurodynamic mobilization in the conservative treatment of cubital tunnel syndrome: long-term follow-up of 7 cases. *J manipulative physiol ther*. 2010;33(2):156-63.

Pannese E. The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv anat, embryol cell biol.* 1981;65:1.

Pannese E, Procacci P. Ultrastructural localization of NGF receptors in satellite cells of the rat spinal ganglia. *J neurocytol.* 2002;31(8):755-63.

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, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:507-38.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. *Arch Inst Pharmacodyn.* 1957;111:209-19.

Ro LS, Chen ST, Tang LM, Jacobs JM. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain.* 1999;79(2-3):265-74.

Rotenstein L, Herath K, Gould RM, de Bellard ME. Characterization of the shark myelin Po protein. *Brain Behav Evol.* 2008;72(1):48-58.

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; 2004. p.20-30.

Santos VR. A influência da mobilização neural do sistema nervoso na câibra do escrivão. *Ter man.* 2004;4:166-71.

Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. In: *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2007.28.

Schünke M. *Prometheus: atlas de anatomia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.300.

Shacklock M. Neural mobilization: a systematic review of randomized controlled trials with an analysis of therapeutic efficacy. *Manual Manipulative Ther.* 2008;16(1):23.

Silva CFd, Langone F. Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration in vivo. *Rev Bras Pesqui Med. Biol.* 1989;6:691-4.

Sluka K, Skyba D, Radhakrishnan R, Leeper B, Wright A. Joint mobilization reduces hyperalgesia associated with chronic muscle and joint inflammation in rats. *J Pain.* 2006;7(8):602-7.

Sluka K, 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;2:154-7.

Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: the principles and practices of statistics in biological research..* San Francisco: Freeman and Company; 1981. 859p.

Sorkin LS, Schafer M. In: *Sattellite Cells*; 2007. Seattle. IASP; 2007. p.443.

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.

Sun Xd, Xu X, Wang F, Zhang X, Ho PCP, Liu H, Qian J, Yu Z, Hongfen Lu, Xu W. Nerve growth factor helps protect retina in experimental retinal detachment. *Ophthalmologica* 2008;61:222-58.

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.

Tortora JG. *Princípios de Anatomia Humana.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p.567.

Treede RD, Meyer RA, Campbell JN. Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiology*. 1998;80(3):1082.

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

Vicenzino B, Collins D, Wright T. Sudomotor Changes Induced by Neural Mobilisation Techniques in Asymptomatic Subjects. *J Manual Manipulative Ther*. 1994;2(2):66-74.

Vicenzino B, Gutschlag F, Collins D, Wright A. An investigation of the effects of spinal manual therapy on forequarter pressure and thermal pain thresholds and sympathetic nervous system activity in asymptomatic subjects: a preliminary report. *Moving in on pain*. Butterworth-Heinemann: Melbourne; 1995. p.186.

Walsh MT. Upper limb neural tension testing and mobilization. Fact, fiction, and a practical approach. *J Hand Ther*. 2005;18(2):241-58.

Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(8):949-65.

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 proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol*. 2003;521:1-21.

Watson JJ, Allen SJ, Dawbarn D. Targeting nerve growth factor in pain: what is the therapeutic potential? *BioDrugs*. 2008;22(6):349-59.

Willis WD, Coggeshall RE. *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord: Primary afferent neurons and the spinal dorsal horn*. Kluwer Academic / Plenum Publishers: Springer Street; 2004. p385.

Woolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med*. 2004;140(6):441-51.

Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*. 1994;62(2):327-31.

Wu CMD, Boustany L, Liang H, Brennan T. Nerve Growth Factor Expression after Plantar Incision in the Rat. *Anesthesiology*. 2007;107:128-35.

Xie W, Strong JA, Zhang JM. Early blockade of injured primary sensory afferents reduces glial cell activation in two rat neuropathic pain models. *Neuroscience*. 2009; 160(4): 847-57.

Yara T, Kato Y, Kataoka H, Kanchiku T, Suzuki H, Gondo T, Yoshii S, Taguchi T. Environmental factors involved in axonal regeneration following spinal cord transection in rats. *Med Mol Morphol*. 2009;42(3):150-4.

Zamberlan LA, Kerppers II. Mobilização neural como um recurso fisioterapêutico na reabilitação de pacientes com acidente vascular encefálico. *Salus*. 2007;2:185-91.

Zhou XF, Deng YS, Chie E, Xue Q, Zhong JH, McLachlan EM, Rush RA, Xian CJ. Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat. *Eur J Neurosci*. 1999;11(5):1711-22.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.

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