

**Joyce Teixeira da Silva**

**Ressonância magnética e ativação neuronal supraespinal  
em modelo de dor neuropática crônica em ratos**

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur  
Co-Orientador: Prof. Dr. Edson Amaro Jr.

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD);

São Paulo  
2016

## RESUMO

Silva JT. Ressonância magnética e ativação neuronal supraespinal em modelo de dor neuropática crônica em ratos. [Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O fator de crescimento neural (NGF) é uma neurotrofina que está intimamente ligada à indução e manutenção dos processos dolorosos, sendo o principal fator relacionado ao aumento de Substância P (SP), importante peptídeo mediador da nocicepção. A análise através da ressonância magnética funcional (fMRI) da chamada “pain matrix”, ou seja, áreas cerebrais relacionadas à dor, vem despertando grande interesse da comunidade científica, uma vez que proporciona um grande conhecimento do sistema nervoso central de forma não invasiva. O Anti-NGF é um tratamento em pesquisa para diversas síndromes dolorosas, no entanto, a participação deste em modelo de neuropatia periférica (constricção crônica do isquiático – CCI) ainda é desconhecida. Neste projeto avaliamos, no modelo de CCI, a resposta comportamental e o possível envolvimento do NGF e da SP antes e após o tratamento com o Anti-NGF. Nossos resultados demonstraram a permanência de altos níveis do NGF a longo prazo no gânglio da coluna posterior (DRG) e na medula espinal, já a SP demonstrou-se aumentada no DRG em ambos os tempos de análise e apenas tardiamente na medula espinal. A seguir, iniciamos o tratamento com Anti-NGF 14 dias após lesão e podemos observar uma melhora no quadro nociceptivo dos animais tratados com este fármaco em comparação ao grupo sem tratamento. Uma vez que houve a melhora no quadro nociceptivo, realizamos análises proteicas para NGF e SP e imuno-histoquímica para Fos. O Anti-NGF foi capaz de reverter os altos níveis de NGF e SP no DRG e na medula espinal. Em relação ao ensaio de atividade neuronal através da quantificação da proteína Fos, observamos um aumento do número de células imunorreativas no grupo CCI e diminuição após tratamento com Anti-NGF no córtex cingulado anterior. A fim de elucidar a participação das áreas encefálicas relacionadas à dor em modelo de dor neuropática crônica nós realizamos uma análise de ressonância magnética funcional. Nossos resultados mostraram modificações da conectividade do tálamo, córtex somatossensorial primário e córtex cingulado com todo o encéfalo, nos auxiliando para a escolha de áreas a serem analisadas por outras técnicas. Em suma, nossos resultados contribuem para reforçar o potencial terapêutico do Anti-NGF como um tratamento para a dor neuropática e enfatizamos que com uma intervenção periférica foi possível intervir, mesmo que indiretamente, na atividade neuronal de um centro supraespinal, bem como mediadores nociceptivos da via dolorosa. Finalmente, esperamos que estes resultados possam ser usados para o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica que auxilie pacientes com dor neuropática crônica, dor caracterizada pelo seu difícil tratamento e efeitos adversos dos fármacos utilizados até hoje.

**Palavras-chave:** Dor neuropática. Fator de crescimento neural. Substância P. Anti-NGF. Ressonância magnética funcional.

## ABSTRACT

Silva JT. Magnetic resonance imaging and supraspinal neuronal activation in chronic neuropathic pain model in rats. [Ph. D. thesis (Morfofuncional Science)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The nerve growth factor (NGF) is a neurotrophin which is closely linked to the induction and maintenance of painful processes, being the main factor related to the increase of substance P (SP), an important peptide mediator of nociception. The analysis by functional magnetic resonance imaging (fMRI) of the "pain matrix", ie, brain areas related to pain, is attracting great interest from the scientific community, as it provides a great knowledge of the central nervous system non-invasively. Anti-NGF treatment is under research for different pain syndromes, however its participation in this model of peripheral neuropathy (chronic constriction injury - CCI) is still unknown. In this project we evaluated the behavioral response in the CCI model and a possible involvement of NGF and SP before and after treatment with Anti-NGF. Our results demonstrated the persistence of high levels of NGF in dorsal root ganglion (DRG) and spinal cord in both times, whereas the SP is increased in DRG in both analysis time and only later in the spinal cord. Next, we began treatment with anti-NGF 14 days after injury and we can observe an improvement in nociceptive behavior of treated animals compared to the untreated group. Since there was an improvement in nociceptive behavior, we performed protein analysis for NGF and SP and immunohistochemistry for Fos. Anti-NGF was able to reverse the high levels of NGF and SP in spinal cord and DRG. For the test of neuronal activity through Fos quantification, an increase in the number of immunoreactive cells on the CCI group and decreased after treatment with Anti-NGF in the anterior cingulate cortex. In order to elucidate the involvement of brain areas related to pain model of chronic neuropathic pain we conducted a functional magnetic resonance analysis. Our results showed changes in the connectivity of the thalamus, the primary somatosensory cortex and cingulate cortex with the whole brain, helping us to choose areas to be analyzed by other techniques. In summary, our results contribute to increasing the therapeutic potential of Anti-NGF as a treatment for neuropathic pain and we emphasized a peripheral intervention was possible to change, even indirectly, the neuronal activity of a supraspinal center and nociceptive mediators. Finally, we hope that these results can be used for the development of a therapeutic strategy that helps patients with chronic neuropathic pain, characterized by its difficult treatment and adverse effects of drugs used today.

**Keywords:** Neuropathic pain. Nerve growth factor. Substance P. Anti-NGF. Magnetic resonance imaging.

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde os primórdios, conforme sugerem registros gráficos, a dor não é expressa do mesmo modo em todas as culturas e seu limiar parece variar não somente de um indivíduo para outro, mas de acordo com o meio social, ou seja, independentemente de suas bases anatômicas e fisiológicas (Teixeira, Osaka, 2010). Dor e inimigos eram colocados no mesmo nível. A dor era considerada ataque à pessoa, punição para uma falta ou atuação de maus espíritos, sendo que os homens e animais reagiriam igualmente com expressões de raiva ou de medo, correspondendo as reações de luta ou de ataque. A partir destes pensamentos a medicina era exercida por sacerdotes que buscavam proporcionar a imortalidade e a cura através de remédios naturais e sacrifícios aos deuses (Tainter, 1948 apud Bonica, 1990; Teixeira, Osaka, 2010)

Na Grécia antiga, Hipócrates postulou a existência de quatro humores: sangue, flegma, bile amarela e bile negra que, quando desequilibrados resultavam em dor (Keele, 1957), já Platão e Aristóteles (Plato, 1885 apud Bonica, 1990; Weberi, 1877 apud Bonica, 1990) acreditavam que dor e prazer eram sensações opostas, residiam no coração e eram paixões da alma. Após aproximadamente quatro séculos, na Roma antiga, conhecimentos adquiridos em Alexandria através das disseções abriram caminho para o trabalho de Galeno (século II), que estudou a fisiologia sensorial e o sistema nervoso, descrevendo a dor como um sinalizador da existência de alterações nos órgãos internos ou no ambiente externo, possuindo portanto a função de alertar e proteger os seres vivos (Galen, {1854-1856?} apud Bonica, 1990).

Séculos mais tarde, Merskey em 1994 definiu a dor como “experiência desagradável primariamente associada a dano tecidual”, definição esta que passou a ser utilizada por outros autores da IASP (Associação Internacional para Estudo da Dor). O Subcomitê de Taxonomia, após modificá-la em 2008, deu a sua formatação final como “experiência sensitiva e emocional associada ao dano tecidual real ou potencial ou à descrição desses danos”, relevando os aspectos emocionais, afetivos e cognitivos da dor (Neto et al., 2009; Treede et al., 2008).

A dor neuropática foi definida pelo NeuPSIG (Grupo de Interesse Especial de Dor Neuropática) em 2008 como “dor que surge como consequência direta de uma lesão ou doença

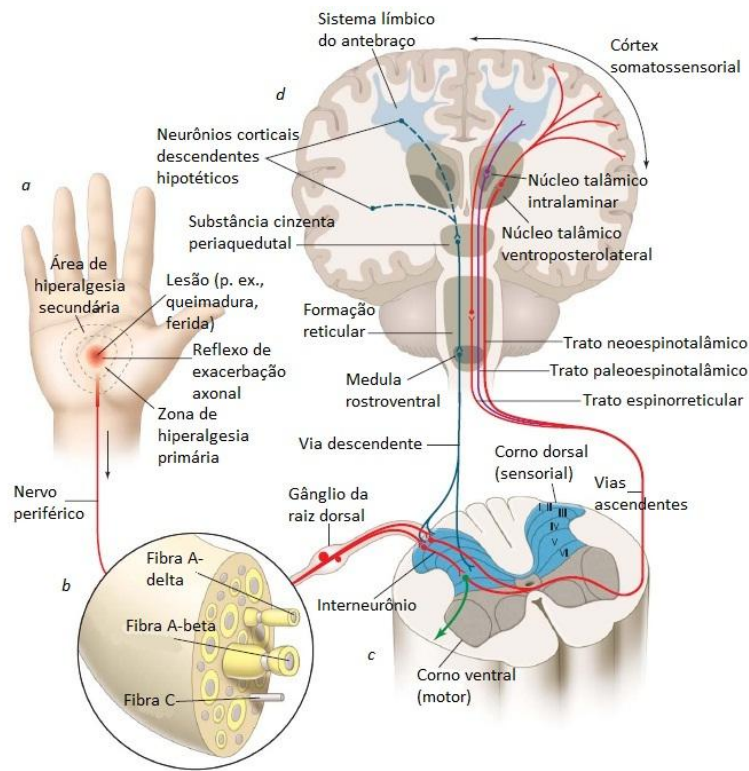
afetando o sistema somatosensorial” (Treede et al., 2008) e caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia (dor induzida por estímulo não nocivo) e hiperalgesia (resposta aumentada a um estímulo nocivo) (Payne, Norfleet, 1986), sendo seus sintomas persistentes além do período de cura. O que nos leva a salientar o impacto que este tipo de dor causa na qualidade de vida do paciente, uma vez que é de difícil tratamento, aumenta a incidência de depressão, ansiedade, transtornos de sono e questões relacionadas ao trabalho (Dworkin et al., 2003).

Vale ressaltar, que as investigações animais podem permitir estudos mecanísticos que não são viáveis em seres humanos, incluindo a exploração translacional de circuitos cerebrais relevantes para o processamento doloroso, bem como a sua modulação por meio de tratamentos analgésicos e os efeitos colaterais do fármaco. No entanto, se o processamento afetivo da dor em animais poderia ser, pelo menos em parte, análogo ao da experiência complexa da dor humana ainda não é sabido. A maior complexidade cortical em espécies superiores é óbvia e as limitações dos modelos animais no estudo das dimensões da dor devem ser consideradas (Becerra et al., 2013).

Os neurônios responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva possuem na periferia terminações não mielinizadas, sendo elas responsáveis pela detecção dos estímulos nocivos de modalidades térmica, mecânica e química (nociceptores – neurônios de primeira ordem), e conversão dos mesmos em sinais elétricos (transdução), estes neurônios ativados através de fibras mielínicas (fibras A-delta – 2 a 20 m/s) e amielínicas (fibras C – 0,5 a 2 m/s) transmitem estes sinais a neurônios de segunda ordem presentes em lâminas da coluna posterior da medula espinal (Vanderah, 2007). O axônio origina-se do corpo celular dos neurônios de primeira ordem presentes no gânglio da raiz posterior ou no gânglio trigeminal e adentra o sistema nervoso central transmitindo o sinal da periferia através da liberação de neurotransmissores associados a dor, como o glutamato e a Substância P (Vanderah, 2007; Woolf, 2007). Os tratos espinotalâmico lateral e espinoreticular (anteriormente chamados de neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico, respectivamente) são formados por neurônios de segunda ordem localizados na coluna posterior da medula espinal (principalmente lâminas I e V), sendo que os neurônios pertencentes ao trato espinotalâmico lateral projetam-se principalmente para os núcleos talâmicos localizados mais lateralmente (VPL e VPM), fazem sinapse com neurônios de terceira ordem que ascendem para o córtex somatossensorial primário implicando

no componente sensitivo-discriminativo da dor, já os neurônios do trato espinoreticular fazem sinapse nos núcleos da formação reticular do tronco encefálico, bem como, enviam colaterais para a substância cinzenta periaquedutal mesencefálica (PAG), o núcleo parabraquial e o hipotálamo, projetam-se também para os núcleos mais mediais do tálamo (intralaminares e mediodorsal), fazendo sinapse com neurônios que ascendem para áreas corticais como o córtex cingulado anterior (ACC), córtex somatossensorial secundário e córtex insular implicando nos aspectos emocionais, afetivos e neurovegetativos associados à dor (Bushnell et al., 2013; Neto et al., 2009).

**Figura 1** - Processamento sensorial na coluna posterior da medula espinal. (a) A estimulação das fibras do tipo C, por lesão intradérmica produz dor espontânea e dor provocada por toques leves no local da lesão (hiperalgesia primária). Além disso, uma área de hiperalgesia secundária fora da área da lesão primária é produzida pela ativação dos receptores NMDA junto ao sistema nervoso central (SNC), que ocorre em consequência aos impulsos nociceptores aferentes. (b) Quando ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, os nociceptores conduzem impulsos aferentes na direção da medula espinal, através de diferentes fibras. (c) A coluna posterior da medula espinal constitui o 1º centro de retransmissão sensorial junto ao SNC. (d) Quando há ativação de áreas localizadas no tálamo e no córtex cerebral, as projeções secundárias ao nível do trato espinotalâmico, trato da coluna dorsal e outras vias nociceptivas levam à percepção consciente da dor.



Fonte: adaptado do website medicina.com

Além destes tratos mencionados podemos destacar a participação dos tratos espinomesencefálico, espinopontoamigdaliano e espinocerebelar que são formados por neurônios de projeção localizados nas lâminas I, V, VII e X da medula espinal. O trato espinomesencefálico estabelece sinapses com a PAG e o colículo superior, o trato espinopontoamigdaliano faz sinapses na região parabraquial da ponte, de onde neurônios se projetam para a amígdala, que por sua vez podem enviar projeções para os gânglios da base. Já no cerebelo, diversos estudos mostram ativação mediante estímulos nocivos e controle motor, porém esta via é pouco esclarecida (Coombes, Misra, 2016; Saab, Willis, 2003). Estes tratos estão envolvidos principalmente com os aspectos afetivo-motivacionais, sistema de recompensa, reações neurovegetativas, medo, memória e aos sistemas inibitórios da dor (Bushnell et al., 2013; Navratilova, Porreca, 2014; Neto et al., 2009).

Estímulos nocivos provocam alterações no sistema nervoso central modificando os mecanismos desencadeados pelos estímulos aferentes, sendo a sensibilização central descrita por um aumento prolongado, mas reversível, na excitabilidade e eficácia sináptica de neurônios das vias nociceptivas, nas quais ocorrem redução do limiar ou aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios da coluna posterior da medula espinal (Woolf, 2011). Campbell et al. demonstraram que estes fatos, na vigência de lesão nervosa periférica, contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática (Campbell et al., 1988).

A teoria da comporta, proposta em 1965 por Melzack e Wall (Melzack, Wall, 1965), destacou o papel dos mecanismos espinal e cerebral na dor aguda e crônica, e desencadeou um avanço explosivo na investigação da dor e terapia. Através de diversos experimentos Melzack também deu origem a teoria da neuromatriz da dor, propondo que a dor é uma experiência multidimensional produzida pela característica de "neuro assinatura" ou *neurosignature* de padrões de impulsos nervosos gerados por uma rede neural amplamente distribuída em todo o encéfalo. Estes padrões de *neurosignature* podem ser desencadeados por estímulos sensitivos, mas também podem ser gerados independentemente deles (Melzack, 2001).

Diversos trabalhos utilizando a ressonância magnética vem definindo as áreas do encéfalo relacionadas à dor como "*pain matrix*" ou matriz da dor, no entanto, os conceitos de matriz da dor são controversos e ainda não existe um verdadeiro consenso sobre quais áreas exatamente

compõem esta matriz (Chen, 2008). Entre estas, as áreas mais comumente ativadas são o córtex somatossensorial primário e o secundário (SI e SII), córtex insular, córtex cingulado anterior, córtex pré-motor e o córtex motor primário, área motora suplementar, córtex pré-frontal, córtex parietal posterior, tálamo, gânglios da base, mesencéfalo e cerebelo (Apkarian et al., 2005; Peyron et al., 2000; Tracey, 2005). A ativação do tálamo lateral, SI e SII parece ser preferencialmente associada ao aspecto sensitivo-discriminativo da dor. A ínsula anterior e o ACC, que pertencem ao sistema límbico, parecem estar associados ao aspecto afetivo-motivacional da dor (Chen, 2008).

Modelos de dor neuropática, como lesão constrictiva crônica (CCI) e lesão limitada do nervo isquiático (SNI) demonstram a presença de hiperalgesia e alodínia mediante estímulos térmicos, químicos e mecânicos, bem como o aumento de mediadores pró-nociceptivos que auxiliam tanto na indução quanto manutenção desta doença (Camara et al., 2015; Casals-Diaz et al., 2009; Hubbard et al., 2015; Hughes et al., 2007; Santos et al., 2012; Seminowicz et al., 2009; Vissers et al., 2003). No entanto, o uso do modelo SNI difere-se do CCI quanto às regiões acometidas na pata ipsilateral à lesão, uma vez que o nervo sural é mantido intacto e áreas não lesadas ao lado de áreas desnervadas são observadas, abrindo margens para o estudo de neurônios aferentes primários lesados *versus* não afetados pela lesão (Jaggi et al., 2011).

Na prática clínica tem sido extensivamente reportado que a dor neuropática é de difícil tratamento devido ao inadequado entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manutenção deste tipo de dor (Aley, Levine, 2002; Sah et al., 2003), e também por tratar-se de uma experiência multidimensional que integra funcionalmente estruturas do sistema límbico e cortical para iniciar a percepção da dor e as respostas a esta lesão (Hunt, Mantyh, 2001).

O NeuPSIG patrocinou o desenvolvimento de diretrizes baseadas em evidências para o tratamento farmacológico da dor neuropática, uma vez que a intervenção terapêutica para o controle deste tipo de dor ainda é um desafio. Os antidepressivos inibidores dos transportadores das monoaminas (tricíclicos) e moduladores da subunidade Alfa2-Delta do canal de cálcio (por exemplo, gabapentina e pregabalina) foram recomendados como opção de primeira linha de tratamento, já a lidocaína tópica, capsaicina tópica em alta concentração e tramadol foram recomendados como tratamentos de segunda linha, sendo então os analgésicos opióides fortes e a toxina botulínica A considerados como tratamentos de terceira linha (Dworkin et al., 2010;



Finnerup et al., 2015). Entretanto a resposta dos pacientes com dor neuropática para muitos destes tratamentos ainda não é satisfatória.

## 1.2 NGF: MECANISMOS E TRATAMENTO

Neurônios nociceptivos do gânglio da raiz posterior ou anteriormente chamado de gânglio da raiz dorsal (DRG) da medula espinal e do gânglio trigeminal são divididos em duas classes principais, a primeira inclui fibras mielinizadas de diâmetro médio (A $\delta$ ) que medeiam a dor aguda, a qual é bem localizada, rápida e precisamente descrita como picada. Estes aferentes mielinizados se diferem consideravelmente das fibras A $\beta$  que respondem a estimulação mecânica não nociva, apresentando diâmetro e velocidade de condução maiores (Basbaum et al., 2009; Neto et al., 2009). Já a segunda classe de nociceptor inclui as fibras amielínicas de pequeno diâmetro (tipo C) que medeiam a dor descrita como mal localizada, lenta e em queimação, podendo ser divididas em não peptidérgicas e peptidérgicas (Snider, McMahon, 1998).

Os neurônios não peptidérgicos, negativos para neuropeptídeos, expressam c-Ret e apresentam fator neurotrófico derivado da glia, já os neurônios peptidérgicos expressam neuropeptídeos, incluindo a Substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), os quais são importantes mediadores nociceptivos (Mantyh et al., 2011). O desenvolvimento dos neurônios peptidérgicos do DRG necessita do fator de crescimento neural (NGF) pertencente à família de fatores de crescimento neurotrófico, as neurotrofinas, que regulam o desenvolvimento e sobrevivência dos neurônios no sistema nervoso periférico e central (Pezet, McMahon, 2006). Os membros da família das neurotrofinas medeiam ações específicas por ligação aos seus correspondentes receptores chamados tirosina quinases (Chao, 1992; Pezet, McMahon, 2006), sendo o TrkA um receptor de alta afinidade para NGF. O NGF é produzido e liberado de tecidos alvos, liga-se a receptores de fibras nervosas C e na maioria de A $\delta$  e é transportado de maneira retrógrada aos neurônios do DRG (Woolf, Mannion, 1999). Este grupo de neurônios do DRG que expressam TrkA é chave na indução da dor neuropática (Pezet, McMahon, 2006) e é inicialmente afetado em lesão de nervo periférico (Krekoski et al., 1996; Santos et al., 2012). Além do TrkA, o receptor neurotrófico de baixa afinidade (p75) também pode contribuir para nocicepção aumentando as ações do TrkA (Obata et al., 2006).

Dois dos neuropeptídeos mais estudados frente à resposta nociceptiva são a SP e o CGRP. A SP é um neuropeptídeo taquicinina que medeia a nocicepção e é utilizado como um

marcador nociceptivo em modelos animais (Ma, Bisby, 1998; Pennefather et al., 2004). Sob condições normais, SP é expressa somente em neurônios do DRG TrkA-positivos de tamanhos médios e pequenos (Pennefather et al., 2004) e durante condições de dor a SP é aumentada nestes neurônios do DRG e liberada nas lâminas I e II da coluna posterior da medula espinal ativando neurônios de segunda ordem (Pennefather et al., 2004). O CGRP também é aumentado sob condições nociceptivas nos mesmos neurônios sensoriais TrkA-positivos (McMahon, 1996).

O NGF é o principal fator relacionado ao aumento da expressão de SP e CGRP (Schmidt et al., 1995) e a administração exógena de altos níveis de NGF, *in vivo* e *in vitro*, aumenta o conteúdo intracelular e a liberação destes dois mediadores (Malcangio et al., 2000a; Skoff, Adler, 2006; Vedder et al., 1993). Baseado em estudos anteriores, nossa hipótese é que o NGF medeia a dor neuropática através do aumento de SP e CGRP. Uma vez que, em resposta ao estímulo nocivo, a SP liberada centralmente estimula neurônios de segunda ordem contribuindo para o processamento nociceptivo central (Henry et al., 1980; Hughes et al., 2007).

Além disso, estudos demonstram a coexistência de SP e glutamato em terminais aferentes primários da lâmina superficial da medula espinal (De Biasi, Rustioni, 1988) e a imunorreatividade deste neurotransmissor excitatório tem sido observada na maioria das terminações nervosas imunopositivas para SP da coluna posterior da medula espinal de ratos (Merighi et al., 1991), sendo presentes os receptores de glutamato tipo AMPA nas sinapses de aferentes primários peptidérgicos (que contém CGRP) (Lagerstrom et al., 2011; Nagy et al., 2004). Portanto, parece provável que estes neurônios utilizem pelo menos duas formas de sinalização para respostas diversificadas: uma de efeito rápido mediada pelo glutamato e uma de efeito lento mediada pelos peptídeos (Lagerstrom et al., 2011).

De acordo com os mecanismos estudados e a hipótese que o NGF produz dor em condições fisiológicas, tem sido demonstrado que o antagonismo de NGF previne o comportamento doloroso (Mantyh et al., 2011). Em modelos de dor neuropática tais como ligação de nervo espinal e lesão constritiva crônica do nervo isquiático, a injeção sistêmica de anticorpos neutralizadores de NGF previne ambas alodinia e hiperalgesia, porém seus mecanismos são pouco conhecidos (Ramer, Bisby, 1999; Ro et al., 1999; Wild et al., 2007). Vale ressaltar, que até o momento estas terapias não comprometem a função normal do nociceptor nem causam perda de inervação das fibras nervosas simpáticas ou sensoriais de pele ou osso (Mantyh et al., 2011).

Em humanos como em modelos animais o NGF subcutâneo provoca hiperalgesia mecânica duradoura (Svensson et al., 2003) e está aumentado em dor crônica, como artrite reumatóide, enxaqueca/dor de cabeça, fibromialgia ou lesão de nervo periférico (Anand et al., 1997; Iannone et al., 2002; Sarchielli et al., 2007). Estas observações sugerem que tanto em humanos quanto em modelos animais a contínua produção de NGF deve estar envolvida no desenvolvimento da dor crônica.

Um grande número de anticorpos monoclonais Anti-NGF humanizados como RN624 (tanezumabe), JNJ-42160443, REGN475, PG110, alfa-D11, AMG-403, os quais exercem seus efeitos analgésicos pelo sequestro do NGF endógeno, estão sendo investigados em testes clínicos com pacientes de vários tipos de dor crônica, no entanto seus estudos se tornam lentos pela carência de trabalhos precisos em determinados modelos animais, os quais mimetizam situações clínicas (Lane et al., 2010; Mantyh et al., 2011; Shelton et al., 1995; Ugolini et al., 2007; Watson et al., 2008).

### 1.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E DOR

A área de neuroimagem vem demonstrando a grande capacidade do cérebro em submeter-se a plasticidade estrutural e funcional relacionada à dor crônica e que tal plasticidade pode ser revertida quando a dor é atenuada (Davis, 2011). A plasticidade cerebral relacionada à dor crônica e tratamento pode ser avaliada através da imagem de ressonância magnética (MRI) estrutural e funcional (May, 2008), incluindo imagem por tensor de difusão para medidas de integridade da substância branca, análises morfométricas para avaliar volume de substância cinzenta e espessura cortical, e ressonância magnética funcional (fMRI) para avaliar a atividade relacionada com a dor e conectividade de regiões com todo o encéfalo (Davis, Moayedi, 2013). Vários estudos relataram que a dor crônica em humanos está associada a alterações anatômicas e funcionais do cérebro, como o volume de substância cinzenta, espessura cortical e atividade neuronal de diversas regiões (Apkarian et al., 2004; Ceko et al., 2015; Davis et al., 2008; Hubbard et al., 2014; Teutsch et al., 2008). Em um modelo de lesão limitada do nervo isquiático (SNI) em rato, Seminowicz et al. relataram diminuição de volume dos córtices pré-frontal e retrosplenial começando aproximadamente ao mesmo tempo que os comportamentos de ansiedade, enquanto que a diminuição do volume cortical no córtex somatossensorial primário

(região da pata posterior), ACC e córtex insular correlacionou-se com a magnitude da hiperalgesia mecânica (Seminowicz et al., 2009).

A fMRI, técnica que possibilita a inferência da atividade neuronal pela medida de variação da oxigenação sanguínea local ou efeito BOLD (*blood oxygenation level dependent*), também revelou em roedores regiões cerebrais relacionadas com o processamento nociceptivo agudo e as respostas mais observadas foram localizadas nos córtices somatossensoriais primário e secundário, córtex insular, ACC, tálamo e PAG (Chen et al., 2008; Thompson, Bushnell, 2012), no entanto a relação entre estas alterações durante fases crônicas ainda é pouco conhecida.

FMRI durante estado de repouso (rsfMRI) também tem sido amplamente usada para mapear as propriedades topológicas de redes cerebrais sem a utilização de nenhum estímulo feito ao paciente ou ao animal (Rubinov, Sporns, 2011; Seminowicz et al., 2012; Wang et al., 2015). Ao contrário da resposta evocada convencional da fMRI, rsfMRI se baseia na identificação de alterações das flutuações intrínsecas do sinal de fMRI. Baliki et al. demonstram que vinte e oito dias após modelo de dor neuropática (lesão limitada do nervo isquiático em ratos - SNI) mudanças de conectividade funcionais foram limitadas a regiões límbicas e interações entre áreas límbica-nociceptivas sem alterações observadas dentro somente da rede sensitiva-nociceptiva, mostrando assim um circuito reorganizado pela dor crônica (Baliki et al., 2014). Além disso, a rsfMRI é capaz de a partir de uma região de interesse (ROI) escolhida pelo investigador demonstrar mapas de conectividade relacionados a esta ROI. Seminowicz et al. observou que o núcleo talâmico VPL está com uma assincronia ou conexão diminuída em relação ao córtex somatossensorial primário após 14 dias de dor neuropática em ratos (Seminowicz et al., 2012). Estudos aprofundados de modificações funcionais são necessários para a compreensão desta plasticidade, bem como para a compreensão da gênese e manutenção dos processos de dor crônica.

## 1.4 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A análise da chamada “*pain matrix*” utilizando a imagem de ressonância magnética ainda é pouco conhecida no que se diz respeito ao modelo de neuropatia periférica e avaliação a longo prazo. Concomitante, o NGF e a SP estão diretamente envolvidos com a indução e manutenção dos processos dolorosos, sob condições de dor neuropática. No entanto, a participação destes em modelo de CCI e após tratamento com Anti-NGF ainda é pouco conhecida.

A nossa hipótese de trabalho é que haverá modificações na ativação neuronal durante estado de repouso nas áreas que compõe a *pain matrix* (tálamo, córtex somatossensorial, córtex insular, córtex cingulado, córtex pré-motor, córtex motor primário, área motora suplementar, córtex pré-frontal, córtex parietal posterior, amígdala e mesencéfalo) nos diferentes grupos experimentais, como observado em humanos com dor neuropática crônica quando comparados com indivíduos controles (Gustin et al., 2010) e em outras síndromes dolorosas (Apkarian et al., 2009; Frokjaer et al., 2012; Lutz et al., 2008). No entanto, ainda são controversas quais as áreas exatamente compõem esta matriz e o processo de plasticidade após dor crônica.

O projeto foi realizado no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor, que por sua vez, tem esta linha de pesquisa já consolidada, sendo o método de Imagem realizado na *University of Maryland* sob orientação do Dr. David Seminowicz (Bolsa BEPE FAPESP n<sup>o</sup> 2014/20983-1) com a máquina de ressonância específica para animais de pequeno porte e juntamente com o Instituto de Radiologia do HC-FMUSP sob orientação do Dr. Edson Amaro Jr. estamos iniciando uma linha de pesquisa de imagem experimental.

## CONCLUSÃO

Em síntese, nós observamos que o processo de nocicepção em nosso modelo é caracterizado por uma longa duração e diferentes padrões de resposta são observados de acordo com o teste comportamental utilizado. O tratamento com Anti-NGF foi capaz de diminuir a nocicepção induzida pela lesão crônica do nervo isquiático, sendo que a intervenção terapêutica proposta promoveu a diminuição de mediadores álgicos, evidenciada por meio da técnica de *Western Blot* no DRG e medula espinal para NGF e Substância P. A administração de dose única do tratamento Anti-NGF na pata lesada do animal diminuiu o nível de ativação neuronal de uma área supraespinal envolvida no aspecto afetivo motivacional da dor, o córtex cingulado anterior. Ainda, a técnica de ressonância magnética funcional facilitou a interpretação dos nossos dados, bem como a criação de um *setup* no Brasil vem sendo desenvolvido para futuros projetos com uso de animais e testes terapêuticos.

A dor neuropática crônica é uma dor caracterizada pelo seu difícil tratamento e efeitos adversos dos fármacos utilizados até hoje, no entanto, com este trabalho apresentamos uma estratégia terapêutica que poderá futuramente auxiliar os pacientes nesta condição.

## REFERÊNCIAS\*

Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience*. 2002;111(2):389-97.

Anand P, Terenghi G, Birch R, Wellmer A, Cedarbaum JM, Lindsay RM, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV. Endogenous NGF and CNTF levels in human peripheral nerve injury. *Neuroreport*. 1997;8(8):1935-8.

Apkarian AV, Baliki MN, Geha PY. Towards a theory of chronic pain. *Prog Neurobiol*. 2009;87(2):81-97.

Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*. 2005;9(4):463-84.

Apkarian AV, Sosa Y, Sonty S, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, Gitelman DR. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J Neurosci*. 2004;24(46):10410-5.

Baliki MN, Chang PC, Baria AT, Centeno MV, Apkarian AV. Resting-state functional reorganization of the rat limbic system following neuropathic injury. *Sci Rep*. 2014;4:6186.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84.

Becerra L, Navratilova E, Porreca F, Borsook D. Analogous responses in the nucleus accumbens and cingulate cortex to pain onset (aversion) and offset (relief) in rats and humans. *J Neurophysiol*. 2013;110(5):1221-6.

Bonica JJ. Definitions and taxonomy of pain. *The management of Pain*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1990.

Bushnell MC, Ceko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(7):502-11.

Camara CC, Araujo CV, de Sousa KK, Brito GA, Vale ML, Raposo Rda S, Mendonca FE, Mietto BS, Martinez AM, Oria RB. Gabapentin attenuates neuropathic pain and improves nerve myelination after chronic sciatic constriction in rats. *Neurosci Lett*. 2015;607:52-8.

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain*. 1988;32(1):89-94.

Casals-Diaz L, Vivo M, Navarro X. Nociceptive responses and spinal plastic changes of afferent C-fibers in three neuropathic pain models induced by sciatic nerve injury in the rat. *Exp Neurol*. 2009;217(1):84-95.

Ceko M, Shir Y, Ouellet JA, Ware MA, Stone LS, Seminowicz DA. Partial recovery of abnormal insula and dorsolateral prefrontal connectivity to cognitive networks in chronic low back pain after treatment. *Hum Brain Mapp*. 2015;36(6):2075-92.

Chao MV. Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron*. 1992;9(4):583-93.

Chen AC. Pain perception and its genesis in the human brain. *Sheng Li Xue Bao*. 2008;60(5):677-85.

Chen FY, Tao W, Li YJ. Advances in brain imaging of neuropathic pain. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121(7): ]653-7.

Coombes SA, Misra G. Pain and motor processing in the human cerebellum. *Pain*. 2016;157(1):117-27.

Davis KD. Neuroimaging of pain: what does it tell us? *Curr Opin Support Palliat Care*. 2011;5(2):116-21.

Davis KD, Moayed M. Central mechanisms of pain revealed through functional and structural MRI. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(3):518-34.

Davis KD, Pope G, Chen J, Kwan CL, Crawley AP, Diamant NE. Cortical thinning in IBS: implications for homeostatic, attention, and pain processing. *Neurology*. 2008;70(2):153-4.

De Biasi S, Rustioni A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(20):7820-4.

Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*. 2003;60(11):1524-34.

Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, Baron R, Gourlay GK, Haanpaa ML, Kent JL, Krane EJ, Lebel AA, Levy RM, Mackey SC, Mayer J, Miaskowski C, Raja SN, Rice AS, Schmader KE, Stacey B, Stanos S, Treede RD, Turk DC, Walco GA, Wells CD. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc*. 2010;85(3 Suppl):S3-14.



Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice AS, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2015;14(2):162-73.

Frokjaer JB, Bouwense SA, Olesen SS, Lundager FH, Eskildsen SF, van Goor H, Wilder-Smith OH, Drewes AM. Reduced cortical thickness of brain areas involved in pain processing in patients with chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10(4):434-8.

Galen. De l'utilité des parties du corps humain, in Daremberg C, (ed): Paris, Euvres Anatomiques et Physiologiques et Médicales, {1854-1856?}.

Gustin SM, Wrigley PJ, Henderson LA, Siddall PJ. Brain circuitry underlying pain in response to imagined movement in people with spinal cord injury. *Pain.* 2010;148(3):438-45.

Henry JL, Sessle BJ, Lucier GE, Hu JW. Effects of substance P on nociceptive and non-nociceptive trigeminal brain stem neurons. *Pain.* 1980;8(1):33-45.

Hubbard CS, Khan SA, Keaser ML, Mathur VA, Goyal M, Seminowicz DA. Altered Brain Structure and Function Correlate with Disease Severity and Pain Catastrophizing in Migraine Patients. *eNeuro.* 2014;1(1):14.

Hubbard CS, Khan SA, Xu S, Cha M, Masri R, Seminowicz DA. Behavioral, metabolic and functional brain changes in a rat model of chronic neuropathic pain: a longitudinal MRI study. *Neuroimage.* 2015;107:333-44.

Hughes DI, Scott DT, Riddell JS, Todd AJ. Upregulation of substance P in low-threshold myelinated afferents is not required for tactile allodynia in the chronic constriction injury and spinal nerve ligation models. *J Neurosci.* 2007;27(8):2035-44.

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

Iannone F, De Bari C, Dell'Accio F, Covelli M, Patella V, Lo Bianco G, Lapadula G. Increased expression of nerve growth factor (NGF) and high affinity NGF receptor (p140 TrkA) in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41(12):1413-8.

Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011;25(1):1-28.

Keele KD. *Anatomies of Pain.* Oxford: Blackwell; 1957. p.206.

Krekoski CA, Parhad IM, Clark AW. Attenuation and recovery of nerve growth factor receptor mRNA in dorsal root ganglion neurons following axotomy. *Neuroscience* 1996;43:1-11.

Lagerstrom MC, Rogoz K, Abrahamsen B, Lind AL, Olund C, Smith C, Mendez JA, Wallen-Mackenzie A, Wood JN, Kullander K. A sensory subpopulation depends on vesicular glutamate

transporter 2 for mechanical pain, and together with substance P, inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(14):5789-94.

Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, Mokhtarani M, Shelton DL, Smith MD, Brown MT. Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*. 2010;363(16):1521-31.

Lutz J, Jager L, de Quervain D, Krauseneck T, Padberg F, Wichnalek M, Beyer A, Stahl R, Zirngibl B, Morhard D, Reiser M, Schelling G. White and gray matter abnormalities in the brain of patients with fibromyalgia: a diffusion-tensor and volumetric imaging study. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3960-9.

Ma W, Bisby MA. Increase of preprotachykinin mRNA and substance P immunoreactivity in spared dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injury. *Eur J Neurosci*. 1998;10(7):2388-99.

Malcangio M, Ramer MS, Jones MG, McMahon SB. Abnormal substance P release from the spinal cord following injury to primary sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 2000;12(1):397-9.

Mantyh PW, Koltzenburg M, Mendell LM, Tive L, Shelton DL. Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain. *Anesthesiology*. 2011;115(1):189-204.

May A. Chronic pain may change the structure of the brain. *Pain*. 2008;137(1):7-15.

McMahon SB. NGF as a mediator of inflammatory pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996;351(1338):431-40.

Melzack R. Pain and the neuromatrix in the brain. *J Dent Educ*. 2001;65(12):1378-82.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965;150(3699):971-9.

Merighi A, Polak JM, Theodosis DT. Ultrastructural visualization of glutamate and aspartate immunoreactivities in the rat dorsal horn, with special reference to the co-localization of glutamate, substance P and calcitonin-gene related peptide. *Neuroscience*. 1991;40(1):67-80.

Nagy GG, Al-Ayyan M, Andrew D, Fukaya M, Watanabe M, Todd AJ. Widespread expression of the AMPA receptor GluR2 subunit at glutamatergic synapses in the rat spinal cord and phosphorylation of GluR1 in response to noxious stimulation revealed with an antigen-unmasking method. *J Neurosci*. 2004;24(25):5766-77.

Navratilova E, Porreca F. Reward and motivation in pain and pain relief. *Nat Neurosci*. 2014;17(10):1304-12.

Neto OA, Costa CMC, Teixeira MJ. *Dor princípios e prática*. Porto Alegre: Artmed S.A.; 2009. p.1438.

- Obata K, Katsura H, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, Noguchi K. Suppression of the p75 neurotrophin receptor in uninjured sensory neurons reduces neuropathic pain after nerve injury. *J Neurosci*. 2006;26(46):11974-86.
- Payne B, Norfleet MA. Chronic pain and the family: a review. *Pain*. 1986;26:1-22.
- Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci*. 2004;74(12):1445-63.
- Peyron R, Laurent B, Garcia-Larrea L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000). *Neurophysiol Clin*. 2000;30(5):263-88.
- Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:507-38.
- Plato. *Phaedo*. Edited with introduction and notes by W.D. Geddes, in London, Macmillan, 1885.
- Ramer MS, Bisby MA. Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment. *Eur J Neurosci*. 1999;11(3):837-46.
- 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.
- Rubinov M, Sporns O. Weight-conserving characterization of complex functional brain networks. *Neuroimage*. 2011;56(4):2068-79.
- Saab CY, Willis WD. The cerebellum: organization, functions and its role in nociception. *Brain Res Brain Res Rev*. 2003;42(1):85-95.
- Sah DW, Ossipo MH, Porreca F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(6):460-72.
- Santos FM, Silva JT, Giardini AC, Rocha PA, Achermann APP, Alves AS, Britto LRG, Chacur M. Neural mobilization reverses behavioral and cellular changes that characterize neuropathic pain in rats. *Molecular Pain*. 2012;8:57.
- Sarchielli P, Mancini ML, Floridi A, Coppola F, Rossi C, Nardi K, Acciarresi M, Pini LA, Calabresi P. Increased levels of neurotrophins are not specific for chronic migraine: evidence from primary fibromyalgia syndrome. *J Pain*. 2007;8(9):737-45.
- Schmidt Y, Unger JW, Bartke I, Reiter R. Effect of nerve growth factor on peptide neurons in dorsal root ganglia after taxol or cisplatin treatment and in diabetic (db/db) mice. *Exp Neurol*. 1995;132(1):16-23.

Seminowicz DA, Jiang L, Ji Y, Xu S, Gullapalli RP, Masri R. Thalamocortical asynchrony in conditions of spinal cord injury pain in rats. *J Neurosci*. 2012;32(45):15843-8.

Seminowicz DA, Laferriere AL, Millecamps M, Yu JS, Coderre TJ, Bushnell MC. MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. *Neuroimage*. 2009;47(3):1007-14.

Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD, Levinson AD. Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci*. 1995;15(1 Pt 2):477-91.

Skoff AM, Adler JE. Nerve growth factor regulates substance P in adult sensory neurons through both TrkA and p75 receptors. *Exp Neurol*. 2006;197(2):430-6.

Snider WD, McMahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*. 1998;20(4):629-32.

Svensson P, Cairns BE, Wang K, Arendt-Nielsen L. Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain*. 2003;104(1-2):241-7.

Tainter ML. Pain. *Ann N Y Acad Sci*. 1948;51(Art 1):3-11.

Teixeira MJ, Osaka M. *História da Dor*. São Paulo, Brasil: Casa Leitura Médica; 2010. p.54.

Teutsch S, Herken W, Bingel U, Schoell E, May A. Changes in brain gray matter due to repetitive painful stimulation. *Neuroimage*. 2008;42(2):845-9.

Thompson SJ, Bushnell MC. Rodent functional and anatomical imaging of pain. *Neurosci Lett*. 2012;520(2):131-9.

Tracey I. Nociceptive processing in the human brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15(4):478-87.

Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008;70(18):1630-5.

Ugolini G, Marinelli S, Covaceuszach S, Cattaneo A, Pavone F. The function neutralizing anti-TrkA antibody MNAC13 reduces inflammatory and neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(8):2985-90.

Vanderah TW. Pathophysiology of pain. *Med Clin North Am*. 2007;91(1):1-12.

Vedder H, Affolter HU, Otten U. Nerve growth factor (NGF) regulates tachykinin gene expression and biosynthesis in rat sensory neurons during early postnatal development. *Neuropeptides*. 1993;24(6):351-7.

Vissers K, Adriaensen H, De Coster R, De Deyne C, Meert TF. A chronic-constriction injury of the sciatic nerve reduces bilaterally the responsiveness to formalin in rats: a behavioral and hormonal evaluation. *Anesth Analg*. 2003;97(2):520-5.

Wang T, Chen N, Zhan W, Liu J, Zhang J, Liu Q, Huang H, He L, Gong Q. Altered effective connectivity of posterior thalamus in migraine with cutaneous allodynia: a resting-state fMRI study with granger causality analysis. *J Headache Pain*. 2015;17(1):016-0610.

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

Weberi W. Aristotelis de Anima Libri Tres. Ad interpretum Graecorum auctoritatem et codicum fidem recognov it commentariis illustrativ Fridr. Adolph. Trendelenburg, Berolini, in 1877.

Wild KD, Bian D, Zhu D, Davis J, Bannon AW, Zhang TJ, Louis JC. Antibodies to nerve growth factor reverse established tactile allodynia in rodent models of neuropathic pain without tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(1):282-7.

Woolf CJ. Central sensitization: uncovering the relation between pain and plasticity. *Anesthesiology*. 2007;106(4):864-7.

Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011;152(3 Suppl):S2-15.

Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. 1999;353(9168):1959-64.