

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA: EFEITO DA NATAÇÃO SOBRE
A ALODINIA MECÂNICA, SEROTONINA E CGRP (PEPTÍDEO
RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA) NO CORNO
DORSAL DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS**

Dissertação de Mestrado

Gisele Agustini Lovatel

Porto Alegre
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**DOR NEUROPÁTICA: EFEITO DA NATAÇÃO SOBRE A
ALODINIA MECÂNICA, SEROTONINA E CGRP (PEPTÍDEO
RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA) NO CORNO
DORSAL DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS**

Gisele Agustini Lovatel

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval Elena

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

Porto Alegre
2009

*Não há saber mais ou saber menos,
há saberes diferentes*

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À Professora **Dra. Matilde Achaval Elena**, minha orientadora, pela dedicação, paciência, orientação, carinho, confiança e valiosos ensinamentos.

À **minha família**, pelo apoio sempre incondicional.

Ao **Jean**, pela compreensão e apoio nos momentos em que mais precisei, pelo amor, amizade e companheirismo. Obrigada pela força e coragem que me ensinou a ter.

Aos meus colegas: **Lígia, Núbia, Vivi, Aline, Márcio, Rafa, Arthiese, Leandro, Felipe, Juliana, Paula, Esdras e Patrícia**, pela amizade, carinho e compreensão, pelos bons momentos e boa convivência. Em especial **Joce** pela dedicação e colaboração nos experimentos e **Simone e Pedro** pela dedicação e apoio, sua forma crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, creio que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos. A todos, muito obrigada pelos momentos que dividimos e pelas histórias que construímos.

Aos estagiários iniciação científica, **Mariane e Sandro**, pelo carinho e dedicação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências que contribuíram para minha formação científica.

Ao Professor Dr. **M. A. Zaro** e ao Instituto Brasileiro de Tecnologia de Couro, Calçado e Artefatos, por emprestar os filamentos de Von Frey utilizados neste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, **Andréia e Beti** e do Biotério **Geni e Carmona**, pela prestatividade nos cuidados diários que fazem a diferença no nosso trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realizar este trabalho, dando as condições necessárias para concluir com qualidade todas as etapas realizadas.

A CAPES - que me concedeu uma bolsa durante a realização deste mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMO	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Informação Nociceptiva	1
1.2. Via Nociceptiva Ascendente	4
1.3. Controle Descendente da Dor	9
1.4. Dor Neuropática	12
1.5. Exercício Físico	16
1.6. Hipótese do Trabalho	18
1.7. Objetivo	18
1.7.1. Objetivo Geral	18
1.7.2. Objetivos Específicos	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1. Experimento 1 – Efeito do protocolo de exercício físico	20
2.1.1. Animais, local de origem e de realização	20
2.1.2. Modelo de dor muscular	21
2.1.3 Naloxona	21
2.1.4. Grupos experimentais	21
2.1.5. Avaliação da alodinia mecânica	23
2.1.6. Exercício físico	25
2.1.7. Desenho experimental	25
2.1.8. Análise estatística	26
2.2 Experimento 2 – Efeito da analgesia opióide induzida pela natação sobre a dor neuropática experimental	26
2.2.1. Animais, local de origem e de realização	26
2.2.2. Modelo de dor neuropática	27
2.2.3. Grupos experimentais	28
2.2.4. Avaliação da alodinia mecânica	28
2.2.5. Exercício físico	29

2.2.6. Desenho experimental	29
2.2.7. Obtenção do tecido nervoso	30
2.2.8. Perfusão transcardíaca	30
2.2.9. Análise histológica	31
2.2.10. Detecção imunoistoquímica	31
2.2.11. Densitometria óptica	33
2.2.12. Análise estatística	34
3. RESULTADOS	35
3.1. Experimento1	35
3.2. Experimento 2	37
3.2.1. Resultados avaliação alodinia mecânica	38
3.2.2.1. Resultados Imunoistoquímica - serotonina	39
3.2.2.2. Resultados Imunoistoquímica - CGRP	41
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	52
6. REFERÊNCIAS	56

LISTA DE ABREVISTURAS

Am	Amígdala
AMPA	Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropionato
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DC	Coluna dorsal
DRG	Gânglio da raiz dorsal
DLF	Funículo dorsolateral
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
LT	Trato de Lissauer
NMDA	Receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato
NRM	Núcleo magno da <i>rafe</i>
NVPM	Núcleo ventral posterior medial
NVPL	Núcleo ventral posterior lateral
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
Rmc	Núcleo reticular magnocelular
Rgc	Núcleo reticular gigantocelular
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Substância P
5-HT	Serotonina
Rgc	Núcleo reticular gigantocelular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático das fibras aferentes das raízes dorsais entrando na medula espinhal	3
Figura 2: Desenho esquemático representando a transmissão da informação nociceptiva	4
Figura 3: Desenho esquemático da secção transversa da medula espinhal mostrando as fibras sensoriais e os locais de sinapse nas diferentes lâminas de Rexed	5
Figura 4: Desenho esquemático dos principais componentes das lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal	6
Figura 5: Desenho esquemático das vias sensoriais do rato	8
Figura 6: Sistema endógeno de controle nociceptivo	10
Figura 7: Desenho esquemático de peptídeos opióides endógenos no SNC	11
Figura 8: Desenho esquemático do processo de sensibilização periférica e central induzida pela lesão nervosa periférica	14
Figura 9: Processamento sensorial do corno dorsal da medula espinhal	16
Figura 10: Local de avaliação da alodinia mecânica com filamentos de Von Frey	23
Figura 11: Tanque utilizado para natação dos ratos	25
Figura 12: Desenho esquemático da constrição crônica realizada no nervo ciático	27
Figura 13: Corte transversal da medula lombar de rato, com a representação da AOI nas lâminas I e II do corno dorsal	34
Figura 14: Resultados da avaliação da alodinia mecânica - Experimento 1	36
Figura 15: Resultados da avaliação da alodinia mecânica - Experimento 2	38
Figura 16: Resultados da imunistoquímica para 5-HT	40

Figura 17: Resultados da imunistoquímica para 5-HT	41
Figura 18: Resultados da imunistoquímica para CGRP	43
Figura 19: Resultados da imunistoquímica para CGRP	44

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de um protocolo de natação sobre a alodinia mecânica e possíveis alterações no corno dorsal da medula espinhal de ratos machos adultos com dor neuropática crônica experimental, induzida por constrição crônica do nervo ciático. No experimento 1 foi testado o efeito do protocolo de natação na produção de analgesia e se este é mediado pelo sistema opióide endógeno em ratos com dor muscular crônica experimental. No experimento 2, estudou-se o efeito da analgesia induzida pelo exercício de natação em animais com dor neuropática experimental, avaliando a alodinia mecânica e as alterações imunoistoquímicas do corno dorsal da medula espinhal. O protocolo de exercício consistiu em natação em água aquecida (36 °C), 30 min diariamente, durante 3 semanas. A alodinia mecânica foi avaliada através de filamentos de Von Frey e foi considerada a diminuição dela quando houve aumento no limiar de retirada frente ao estímulo mecânico com filamentos de Von Frey. A avaliação das alterações no corno dorsal da medula espinhal foram realizadas através de análise da imunorreatividade da serotonina e do CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina). Os resultados mostraram que o protocolo de natação foi capaz de produzir analgesia opióide endógeno no modelo de dor muscular. Entretanto, no modelo de dor neuropática a natação não produziu analgesia. O modelo de dor neuropática levou a diminuição do CGRP ipsilateral à lesão, em contrapartida, não foi encontrada alteração serotoninérgica entre ambos os grupos. Em conclusão, a natação é capaz de produzir analgesia no modelo de dor muscular, entretanto, na dor neuropática, que envolve um sistema mais complexo incluindo possíveis modificações centrais, a natação não produziu analgesia.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a *International Association for the Study of Pain (IASP, 1986)* dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual atual ou potencial e que envolve respostas neurovegetativas, comportamentais e psicológicas. Apresenta caráter subjetivo, o que a torna exclusiva dos seres humanos que possuem a capacidade de verbalizá-la. Assim, a dor difere da nocicepção, que se refere aos mecanismos pelos quais a dor é transmitida ao sistema nervoso central (SNC) (BONICA *et al.*, 2001).

A dor pode ser classificada, com base na duração, como aguda ou crônica. Dor associada com dano tecidual, inflamação ou doença com duração breve (horas ou dias), independente da intensidade, é freqüentemente referida como aguda. Dor que persiste por longos períodos de tempo (meses ou anos), que acompanha uma doença ou que está associada com uma lesão que não é resolvida por um período previsto de tempo é referida como crônica (PARENT 1996; BONICA, *et al.*, 2001).

1.1. Informação Nociceptiva

A informação nociceptiva inicia-se pela ativação de receptores denominados nociceptores que são terminações nervosas livres, devido ao fato da região receptora ser o próprio terminal axonal. Estes receptores são os

responsáveis pela captação de estímulos potencialmente lesivos e encontram-se na maioria das estruturas corporais, incluindo integumento, músculos, articulações e vísceras (WILLIS e WESTLUND, 1997; BEAR *et al.*, 2003; PURVES *et al.*, 2005). Após a transdução dos sinais químicos, térmicos e mecânicos de alta intensidade, pelos nociceptores, essa informação é conduzida através de fibras aferentes primárias. De um modo geral, essas fibras possuem corpos celulares que se localizam no gânglio da raiz dorsal dos nervos espinhais. A informação segue até o SNC para seu processamento e análise.

As fibras aferentes primárias relacionadas à nocicepção são classificadas em dois tipos de acordo com sua estrutura e velocidade de condução: fibras A δ , pouco mielinizadas, com diâmetro entre 1 e 5 μm e velocidade de condução entre 5 e 35 m/s e fibras C, não mielinizadas, com diâmetro entre 0,2 e 1,5 μm e velocidade de condução entre 0,5 e 2 m/s . Ambas entram no corno dorsal da medula espinhal e ramificam-se em colaterais ascendentes e descendentes, constituindo o trato de Lissauer (Figura 1) (FIELDS, 1987; KANDEL, 2003; PARENT, 1996; BONICA, *et al.* 2001; JULIUS e BASBAUM, 2001).

A experiência da dor pode ser acentuada pela lesão periférica, pois este processo leva a sensibilização do nociceptor para estímulos térmicos e mecânicos. Este fenômeno resulta, em parte, da produção e liberação de mediadores químicos do terminal sensorial primário e de células não neurais (fibroblastos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas) no ambiente (WALL e MELZACK, 2006).

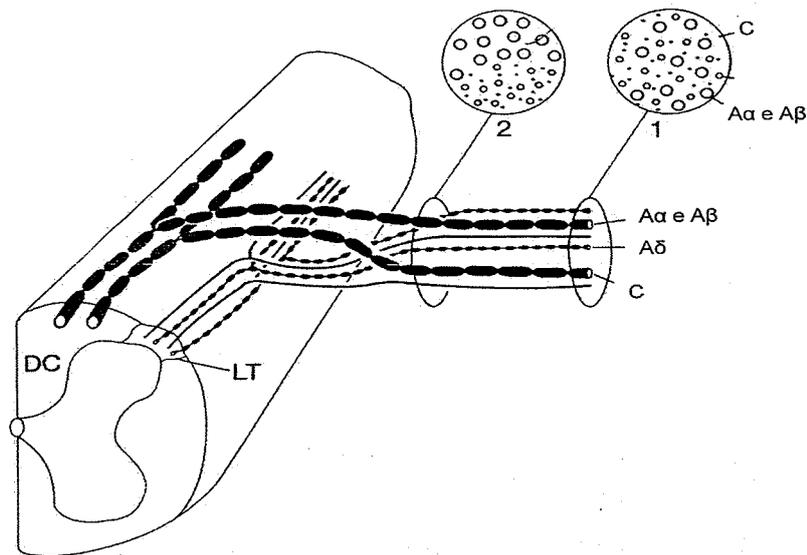


Figura 1: Desenho esquemático das fibras aferentes das raízes dorsais entrando na medula espinhal. Fibras A α e A β consistem em aferentes mielinizados, de grande calibre, respondem a estímulos inócuos, que entram na medula espinhal através da coluna dorsal (DC); Fibras A δ e C, de pequeno diâmetro, que respondem a estímulos nocivos, entram através do trato de Lissauer (LT). 1: Distante da medula espinhal os axônios de diferentes diâmetros estão distribuídos aleatoriamente. 2: Próximo da medula espinhal, os axônios das fibras A α e A β localizam-se dorsomedialmente e as fibras A δ e C dorsolateralmente (adaptado de Fields, 1987).

Alguns componentes inflamatórios podem alterar a excitabilidade neuronal diretamente por interagir em canais na superfície do nociceptor considerando que outros ligantes de receptores metabotrópicos (bradicinina e NGF) medeiam seus efeitos através de ativação de cascatas de segundos mensageiros (WOOLF e SALTER, 2000). A complexidade molecular do nociceptor aferente primário é ilustrada pela resposta a mediadores inflamatórios liberados no local da lesão (Figura 2). Alguns destes componentes inflamatórios liberados localmente incluem peptídeos (bradicinina), lipídeos (prostaglandinas), neurotransmissores (serotonina e ATP) e neurotrofinas (NGF). Estes fatores sensibilizam (diminuindo o limiar) ou excitam o terminal do nociceptor pois interagem com os receptores expressos

por estes neurônios. Ativação do nociceptor não somente transfere a informação nociceptiva para a medula espinhal (e desta para o encéfalo), mas também inicia um processo de inflamação neurogênica. Esta é uma função eferente do nociceptor que libera neurotransmissores como substância P e CGRP dos terminais periféricos induzindo vaso dilatação e extravasamento plasmático, assim como ativação de célula não neurais incluindo mastócitos e neutrófilos. Estas células contribuem para o processo inflamatório local (Figura 2; FIELDS, 1987).

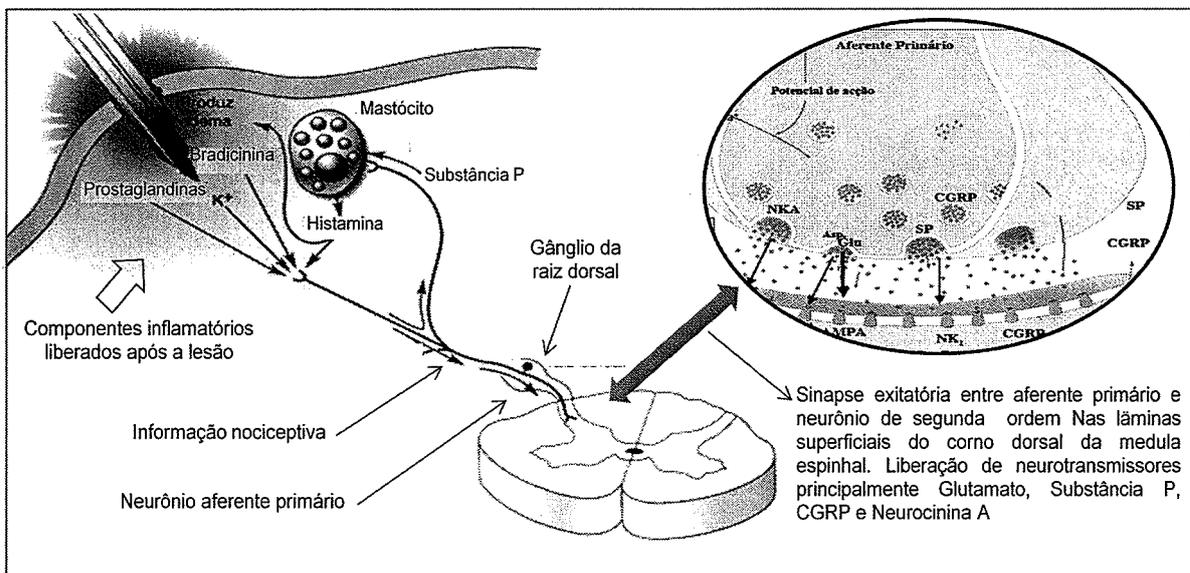


Figura 2: Desenho esquemático representando a transmissão da informação nociceptiva até o corno dorsal da medula espinhal (modificado de Julius e Basbaum, 2001; Furst, 1999).

1.2. Via Nociceptiva Ascendentente

Uma vez que um estímulo potencialmente lesivo tenha gerado um potencial de ação no nociceptor, a informação é conduzida, através das fibras aferentes A δ e C até a medula espinhal. No corno dorsal da medula espinhal os axônios se ramificam em colaterais ascendentes e descendentes, constituindo o trato de Lissauer, que interconecta diferentes segmentos medulares. Ao penetrarem na substância cinzenta as fibras A δ e C fazem sinapse com neurônios da Lâmina I, II e V de Rexed (Figuras 3 e 4; SUGIURA, 1986; FIELDS, 1987).

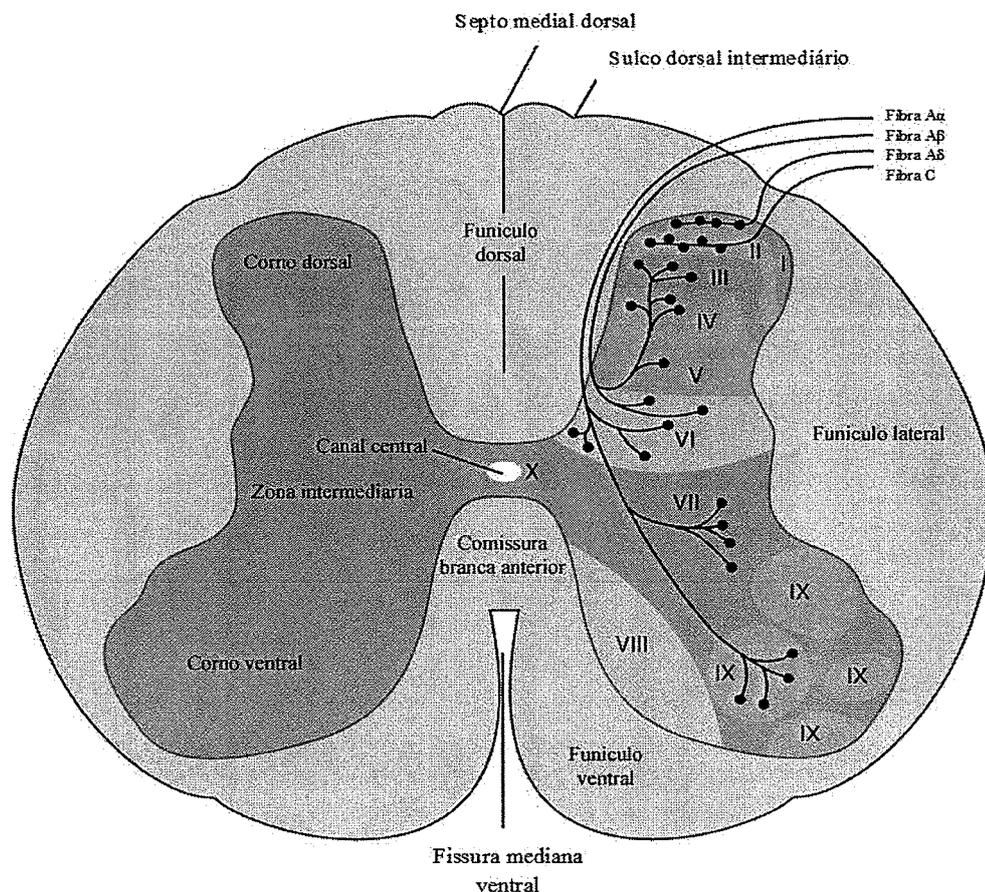


Figura 3: Desenho esquemático da seção transversal da medula espinhal, mostrando as fibras sensoriais (incluindo as aferentes primárias nociceptivas) e os locais de sinapse nas diferentes lâminas de Rexed (adaptado de Squire *et al.*, 2002).

Os neurônios ganglionares de primeira ordem, que originam as fibras aferentes primárias nociceptivas, liberam neurotransmissores excitatórios como glutamato, substância P, neurocinina A e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) na fenda sináptica entre eles e os neurônios de segunda ordem na medula espinhal (Figura 2; BASBAUM e WOOLF, 1999; MILLAN, 1999). O glutamato é o principal neurotransmissor utilizado pela via nociceptiva interagindo com receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e receptor cainato de neurônios localizados nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (BONICA *et al.*, 2001).

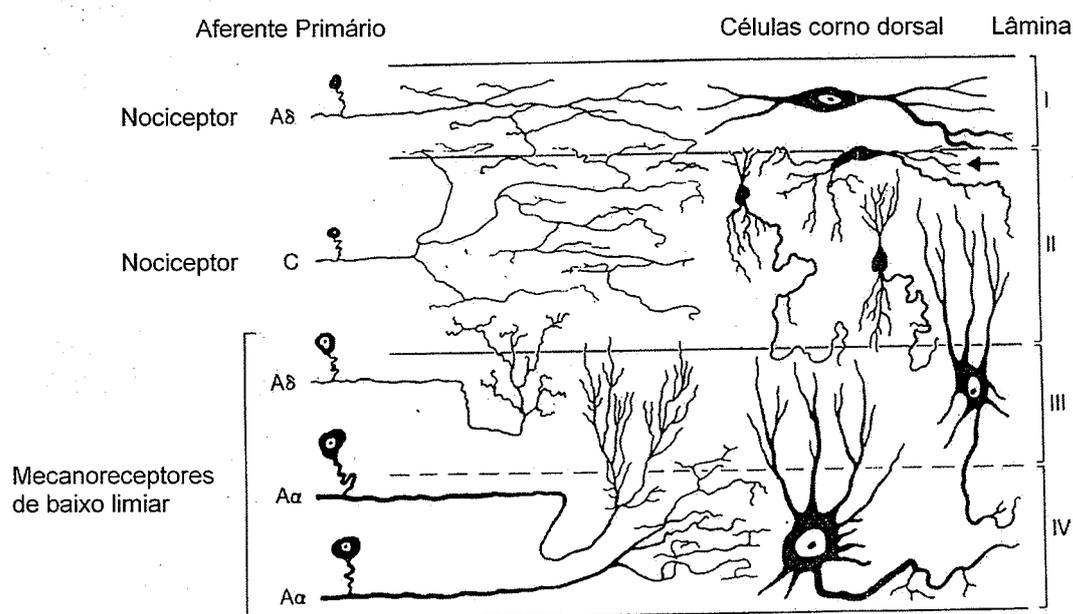


Figura 4: Desenho esquemático dos principais componentes das lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal. O nociceptor aferente primário envia informação através de fibras A δ e C que terminam principalmente nas lâminas I e II do corno dorsal. A região mais profunda da lâmina II e lâminas III e IV recebem entrada somente de fibras aferentes primárias mielinizadas, as quais respondem a estímulos não nocivos. Células de segunda ordem também são encontradas nos diferentes níveis, incluindo células maiores nas lâminas I, III e IV, as quais incluem neurônios de projeção nociceptivos e células menores localizadas na lâmina II. Apesar das

projeções para regiões supraespinhais, muitos neurônios estabelecem conexões locais (adaptado de FIELDS, 1987).

A principal via ascendente que transporta a sensibilidade dolorosa é o *fúnculo ântero-lateral*. Por ele seguem: fibras espinotalâmicas, que terminam em diferentes núcleos do tálamo; fibras espinoreticulares, que fazem sinapse nos núcleos da formação reticular do bulbo e da ponte e vão terminar no tálamo; e fibras do trato espinomesencefálico, que termina no mesencéfalo, na substância cinzenta periaquedutal, na formação reticular e no colículo superior e posteriormente seguem ao hipotálamo (PAZO, 2004).

A principal via responsável por conduzir informação sobre dor da medula espinhal para o diencéfalo, em humanos, é o trato espinotalâmico (WILLS e WESTLUND, 1997; GYBELS e SWEET, 1989). Existem evidências de experimentos comportamentais que o trato espinotalâmico é igualmente importante para a transmissão de informação nociceptiva em ratos (PESCHANSKI, *et al.*, 1986; PALECEK *et al.*, 2002).

O trato espinotalâmico é constituído pela informação dos neurônios da lâmina I em conjunto com os da lâmina V que cruzam a linha média e ascendem até o tronco encefálico e o tálamo. A lâmina II envia projeções para outros níveis (lâminas IV, V e VI) antes de ascender por esta via. Fibras que conduzem informação nociceptiva da face fazem sinapse com neurônios do núcleo talâmico ventral posterior medial (NVPM), enquanto as fibras do restante do corpo fazem sinapse no núcleo talâmico ventral posterior lateral (NVPL). Das projeções talâmicas a informação segue ao córtex somatossensorial primário o qual realiza o processamento e a percepção da

informação nociceptiva (Figura 5; BONICA *et al.*, 2001; KANDEL *et al.*, 2003; PAXINOS, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2004; PURVES *et al.*, 2005).

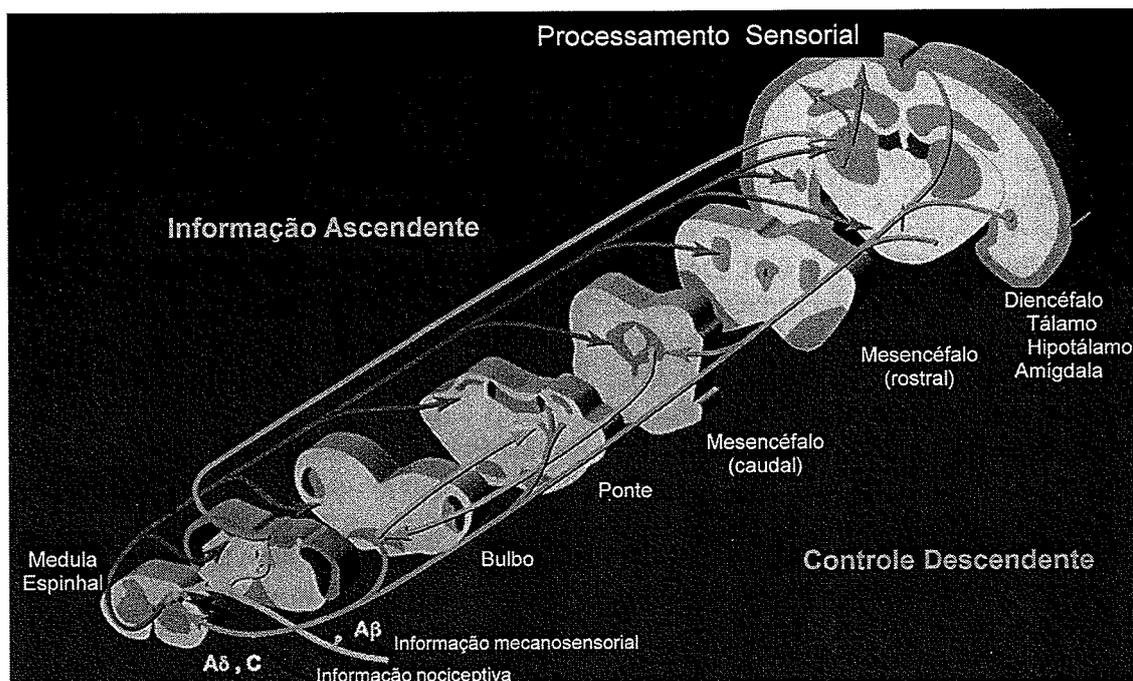


Figura 5: Desenho esquemático das vias sensoriais do rato (modificado de WILLIS *et al.*, 2004).

A dor é um fenômeno complexo que inclui um sensorial-discriminativo e outro afetivo-emocional. Ambos vão pelas vias anteriormente mencionadas, porém de forma discriminada. Assim, do ponto de vista funcional descrevem-se dois sistemas de fibras, independente do trato anatômico ao qual pertencam, os sistemas neoespinotalâmico e o paleoespinotalâmico (PAZO, 2004).

Sistema neoespinotalâmico, é o responsável pelos aspectos sensorial-discriminativos da dor, tais como a percepção da qualidade da dor e de sua localização, intensidade e duração. É constituído por todas as fibras que terminam no núcleo ventral posterior do tálamo (PAZO, 2004).

Sistema paleoespinotalâmico, está relacionado com o componente afetivo-emocional da dor, inclui atenção, ativação do EEG, os reflexos

somáticos, os neurovegetativos, as respostas endócrinas e as mudanças emocionais que, em seu conjunto, originam a natureza desagradável do estímulo doloroso. Formam esse sistema as fibras que terminam nos núcleos intralaminares do tálamo e em estruturas do sistema límbico (hipotálamo, amígdala, globo pálido ventral, estriado ventral) (PAZO, 2004) e no rato, no tálamo medial (FIELDS, 1987).

1.3. Controle Descendente da Dor

O processamento de estímulos nociceptivos pode ser modulado pelo encéfalo e pela medula espinhal (CASEY, 1999). A transmissão nociceptiva a nível espinhal está sujeita a regulação através de neurônios descendentes localizados em diferentes núcleos (Figura 6). Áreas do tronco encefálico, principalmente substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo dorsal da *rafe*, formação reticular mesencefálica; núcleo magno da *rafe* (NRM), núcleo reticular magnocelular (Rmc) e *locus ceruleus*, da medula oblonga, são responsáveis por enviar fibras descendentes à medula espinhal com funções inibitórias sobre os circuitos medulares da dor (FIELDS e BASBAUM, 1978; WILLIS e WESTLUND, 1997; PRADO e FAGANELLO, 2000).

Os núcleos magno da *rafe*, rico em serotonina (5-HT) e substância P (SP) e o núcleo reticular magnocelular, recebem aferências excitatórias provenientes da PAG e enviam aferências à medula espinhal. Fibras eferentes que se originam no NRM e Rmc enviam através do funículo dorsolateral e controlam os impulsos nociceptivos da substância gelatinosa (lâmina II), que

são ativados por aferências sensitivas (fibras A δ e C) ricas em substância P (SP), projetam-se a níveis supra-espinhais, e indiretamente, via núcleo reticular gigantocelular (Rgc), ativam as células do sistema descendente do controle antinociceptivo da PAG e NRM, formando uma alça de retroalimentação negativa (FIELDS, 1987).

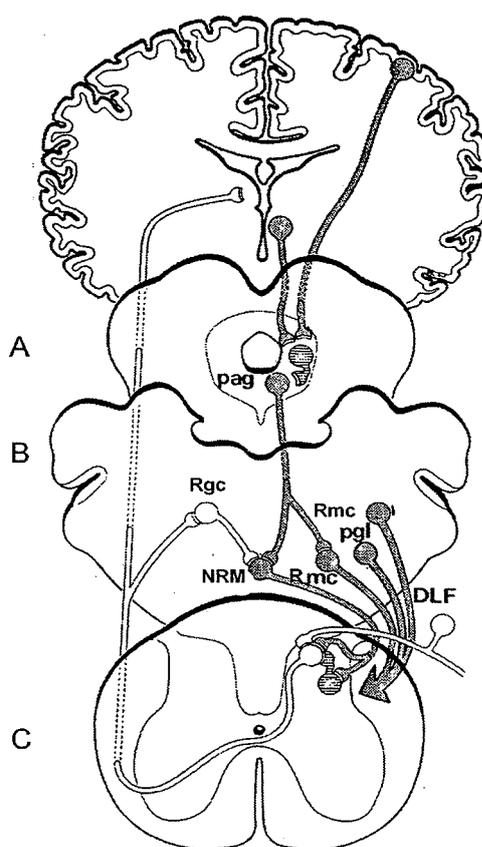


Figura 6: Sistema endógeno de controle nociceptivo como proposto por Basbaum e Fields (1978). A) Nível mesencefálico: Substância cinzenta periaquedutal (pag). B) Nível bulbar: Núcleo magno da rafe (NRM); Núcleo reticular magnocelular.(Rmc) C) Nível espinhal: Fibras que se originam no NRM e Rmc enviam através do funículo dorsolateral (DLF). Neurônios nociceptivos da lâmina II são ativados por aferências sensitivas que se projetam a níveis supra-espinhais e indiretamente, via núcleo reticular gigantocelular (Rgc) ativa células do sistema descendente de controle antinociceptivo da PAG e NRM (adaptado de FIELDS, 1987).

As fibras oriundas do tronco encefálico são responsáveis pela liberação de neurotransmissores, como serotonina e substância P, ativando

interneurônios localizados principalmente nas lamínas I, II e V do corno dorsal. Quando ativados esses interneurônios liberam neuropeptídeos opióides (BASBAUM e FIELDS, 1984; ALMEIDA *et al.*, 2004). As três principais famílias de peptídeos opióides endógenos são: encefalina, β -endorfina e dinorfina e estão distribuídas em distintas áreas do SNC (Figura 7; FIELDS, 1987).

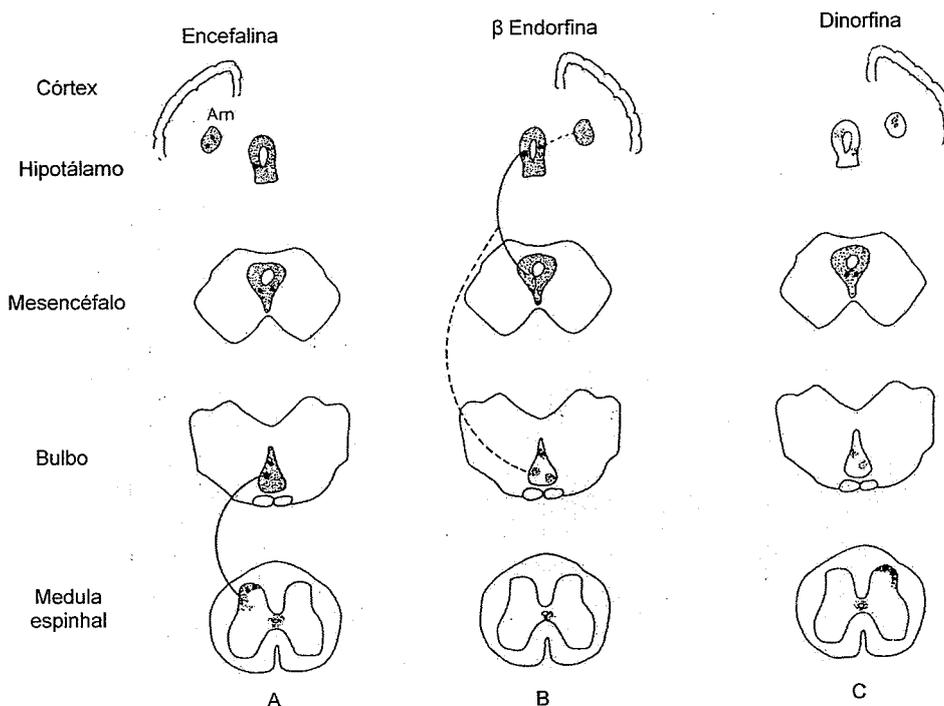


Figura 7: Desenho esquemático da distribuição de peptídeos opióides endógenos no SNC. Algumas estruturas envolvidas na transmissão e modulação da dor estão incluídas. A: células contendo encefalina estão presente na amígdala (Am), hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal no mesencéfalo, bulbo e medula espinhal. B: células contendo β -Endorfina estão presentes no hipotálamo e núcleos do trato solitário, enviam axônios para substância cinzenta periaquedutal e *locus ceruleus*. C: células contendo dinorfina encontram-se no hipotálamo, mesencéfalo, bulbo e medula espinhal (adaptado de FIELDS, 1987).

Estes atuam sobre receptores δ , κ e μ localizados nos neurônios aferentes primários e secundários, promovendo a inibição pós-sináptica dos

neurônios de projeção que conduzem a informação nociceptiva em direção ao encéfalo (BENNETT, 1982; BASBAUM e FIELDS, 1984; BONICA *et al.*, 2001).

1.4. Dor Neuropática

A dor neuropática é referida como a dor resultante de um dano ao sistema nervoso incluindo nervos periféricos, medula espinhal e algumas regiões do SNC (ZIMMERMANN, 2001). Pacientes com dor neuropática normalmente sofrem de dor espontânea, alodinia (sensação de dor devido à estimulação não nociva, como um toque leve ou calor inócuo) e hiperalgesia (resposta excessiva à dor após um estímulo nocivo) (WOOF e MANNION, 1999; BARON, 2006).

Por outro lado, a dor neuropática periférica resulta de danos ao sistema nervoso periférico, podendo envolver ou não a estimulação direta de nociceptores (PORTENOY, 2007). Sua etiologia inclui trauma, compressão, neurotoxinas, infecção, doenças metabólica e imune, tumores, deficiência de vitaminas ou outras causas (WANG e WANG, 2003).

Durante os últimos 30 anos, vários modelos experimentais de neuropatia periférica têm sido desenvolvidos, especialmente em roedores, e suas manifestações fisiopatológicas e comportamentais são semelhantes às aquelas observadas em humanos. Os modelos diferem na forma e na localização da lesão, incluindo transecção (WALL, *et al.*, 1979), ligação frouxa do nervo ciático (SELZER, 1990) ou ligação apertada dos nervos espinhais L5 e L6 (KIM e CHUNG, 1992), crioneurólise (DeLEO, *et al.*, 1994), *crush* (DEVOR, *et al.*, 1979), inflamação perineural (DeLEO, *et al.*, 2001) e tumor (SHIMOYAMA, *et al.*, 2002). Existem muitos fatores que influenciam o desenvolvimento de

comportamento de dor neuropática em ratos, incluindo fatores genéticos (DEVOR e RABER, 1990; XU *et al.*, 2001) e a idade (LEE e CHUNG, 1996; KIM *et al.*, 1995).

O modelo da dor neuropática em roedores, baseados em ligação frouxa e crônica do nervo ciático (BENNETT e XIE, 1988), mostra alodinia e hiperalgesia (térmica e mecânica) que são evidenciadas por diminuição do limiar de retirada frente a estímulos mecânicos e térmicos (inócuos e/ou nocivos). Também pode ser verificada dor espontânea pela presença de *grooming*, cuidado excessivo do membro lesionado e grau importante de autotomia (BENNETT e XIE, 1988; ZIMMERMANN, 2001). Além disso, este modelo de dor neuropática apresenta entre outras alterações: edema intraneural, diminuição do transporte axoplasmático, desmielinização do nervo ciático (BENNETT e XIE, 1988), grande perda de fibras A α , A β , A δ e C na região ligada, diminuição da velocidade de condução (COGGESHALL *et al.*, 1993; KAJANDER e BENNETT, 1992) e a presença de atividade espontânea e ectópica próximo à lesão (COGGESHALL *et al.*, 1993; KAJANDER e BENNETT, 1992).

Após lesão nervosa periférica, os axônios distais à lesão sofrem degeneração walleriana. Fibras intactas estão próximas de axônios degenerando e por isso estão expostas a um ambiente alterado que contém fatores que podem afetar os terminais nociceptivos diretamente ou indiretamente por uma alteração no corpo celular do nociceptor. Esta condição pode levar ao desenvolvimento de sensibilização periférica ou central. A sensibilização periférica envolve a sensibilização do nociceptor aferente primário, induzindo uma resposta aumentada aos estímulos mecânicos

(hiperalgesia mecânica). A degeneração walleriana pode levar ao desenvolvimento de atividade espontânea do nociceptor. Esta atividade espontânea pode induzir um estado de sensibilização central, a qual resulta em uma resposta dolorosa após estímulo mecânicos inócuos (alodinia). Assim, a degeneração walleriana, na região distal do nervo lesionado, pode explicar, em parte, o desenvolvimento da hiperalgesia e alodinia na dor neuropática (Figura 8; WALL e MELZACK, 2006).

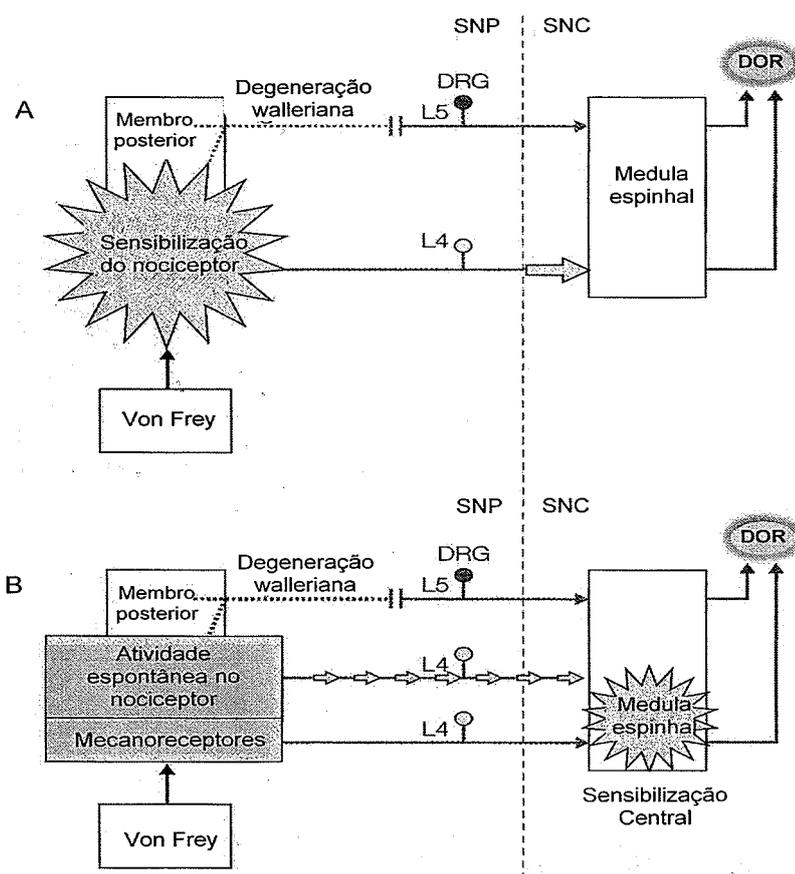


Figura 8: Desenho esquemático do processo de sensibilização periférica e central induzido pela degeneração walleriana após lesão nervosa periférica. A: Sensibilização periférica. B: Sensibilidade central. DRG, gânglio da raiz dorsal; SNP, sistema nervoso periférico; SNC, sistema nervoso central. (adaptado de Wall e Melzack, 2006).

Os mecanismos exatos da instalação do quadro de dor neuropática ainda não estão inteiramente compreendidos, devido em parte, à plasticidade

gerada no SN que implica em uma cadeia de eventos imprevisíveis e complexos a serem traçados (JENSEN e BARON, 2003). No entanto, MacFarlane e colaboradores (1997) sugerem que o desenvolvimento da dor crônica após lesão de nervo periférico, deva-se à ocorrência de alguns processos na medula espinhal, como excitabilidade aumentada, inibição diminuída, reestruturação organizacional das células e mudança de fenótipo.

A nível molecular acredita-se que a constrição crônica do nervo ciático resulta em descargas ectópicas e contínuas do neurônio aferente primário, resultando em uma liberação aumentada de neurotransmissores excitatórios principalmente glutamato e substância P. Primeiramente ocorre a abertura de canais AMPA, permitindo um influxo de Na^+ e posteriormente, por haver despolarização e continuação da oferta de neurotransmissores excitatórios na fenda sináptica, ocorre a abertura de canais NMDA, resultando na entrada de Ca^+ no neurônio pós-sináptico. A entrada excessiva de Ca^+ resulta em uma prolongada atividade neuronal, conhecida como "Wind up", que pode levar a morte neuronal. Quando isso ocorre, a fibra C retrai-se e observa-se migração de fibras mielinizadas A β (fibras sensoriais que respondem apenas a estímulos inócuos) localizadas na lâmina III, para a lâmina II, resultando em respostas dolorosas ligadas à estimulação tátil (Figura 9; WOOLF, 1983; WOOLF e MANNION, 1999; BENNETT, 1999; ZIMMERMANN, 2001; KOLESNIKOV *et al.*, 2007). A projeção dessas fibras para uma região que normalmente processa impulsos transmitidos por fibras aferentes primárias C, dá suporte à hipótese de que essas fibras expandidas têm um papel no desenvolvimento e/ou manutenção da alodinia observada na dor neuropática (LEKAN *et al.*, 1996; SHORTLAND *et al.*, 1993).

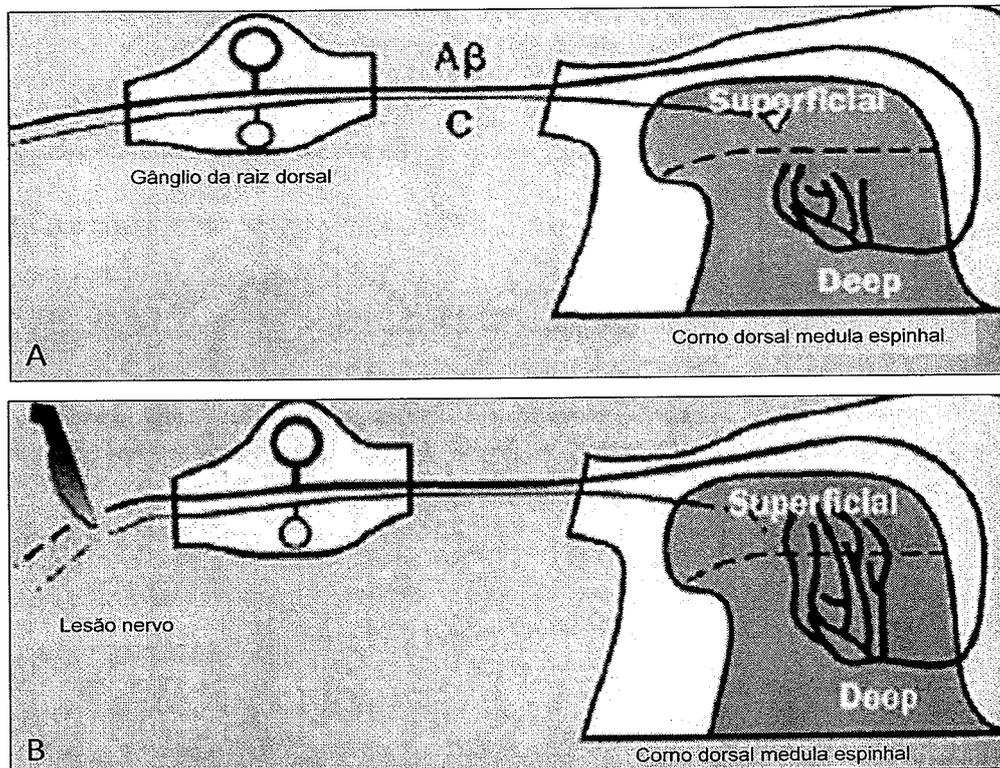


Figura 9: Processamento sensorial no corno dorsal da medula espinhal. A) Terminação normal do aferente primário no corno dorsal da medula espinhal. Fibras A β estabelecem sinapse nas lâminas profundas (III) e fibras C nas lâminas superficiais (I e II). B) Após a lesão nervosa, terminais de fibras C retraem e de fibras A β migram para lâmina superficial do corno dorsal (modificado de Woolf e Mannion, 1999).

1.5. Exercício Físico

O exercício físico é um importante componente no controle de condições dolorosas, sendo utilizado no tratamento de disfunções musculoesqueléticas crônicas (BEMENT e SLUKA, 2005). O exercício físico promove liberação de peptídeos opióides, podendo diminuir a hiperalgesia e a alodinia mecânica em

modelos experimentais de dor muscular não inflamatória (DROSTE, *et al.*; HOFFMAN, *et al.*; BEMENT e SLUKA, 2005).

A natação é uma forma satisfatória de exercício que oferece mínima carga sobre as articulações e permite grande facilidade de movimento. Esta modalidade apresenta menor estresse mecânico devido à flutuação, redução dos efeitos da gravidade, bem como uma melhor redistribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos (CAMPION, 2000).

Em ratos, a natação é considerada uma habilidade inata. Estudos revelam ocorrências de adaptações ao treinamento físico semelhantes às observadas em humanos (GOBATTO *et al.*, 2001).

Além disso, pesquisas sobre o efeito da natação em ratos demonstraram uma melhora na regeneração de nervo ciático (GUTMAN *et al.*, 1963), melhora transitória da alodinia em casos de injúria medular (HUTCHINSON *et al.*, 2004), diminuição da hiperalgesia e decréscimo da dor (BEMENT e SLUKA, 2005), redução da atrofia muscular durante período de denervação por esmagamento do nervo ciático (JAWEED *et al.*, 1974; IRINTCHEV *et al.*, 1991), aumento da síntese e liberação de serotonina no córtex cerebral, tronco encefálico e medula espinhal (DEY *et al.*, 1992), além de produzir analgesia em modelos de dores inflamatória e neuropática (KUPHAL *et al.*, 2007). Entretanto, Araujo e colaboradores, (2008) observaram que natação em água a 36 °C durante a regeneração do nervo ciático após esmagamento, não interferiu na recuperação funcional dos ratos.

1.6. Hipótese de trabalho

O exercício físico é uma abordagem terapêutica muito utilizada no tratamento da dor. Embora existam vários estudos sobre os efeitos do exercício físico na dor, em especial na dor neuropática ainda é um tema que permanece pouco esclarecido. Estudos têm demonstrado que o exercício físico promove diminuição da alodinia em modelos experimentais de dor muscular, assim como a recuperação funcional e aceleração da regeneração e remielinização em modelos experimentais de lesão de nervo periférico. Ainda, promove liberação de fatores neurotróficos e produz analgesia mediada pelo sistema opióide. No entanto, se torna necessário o estudo sobre os efeitos do exercício físico, sobre a dor neuropática avaliando a alodinia mecânica e alterações imunistoquímicas do corno dorsal da medula espinhal de ratos machos com dor neuropática experimental (BASBAUM e FIELDS, 1984; DEY, 1992; KOLESNIKOV, 2007).

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos da natação sobre a alodinia mecânica e possíveis alterações de mediadores químicos no corno dorsal da medula espinhal de

ratos machos adultos com dor neuropática crônica experimental, induzida por constrição crônica do nervo ciático.

1.7.2. Objetivos específicos

- Estudar o efeito do protocolo de exercício físico de natação em água aquecida (36 °C), diário, durante 3 semanas, na produção de analgesia mediada pelo sistema opióide ou não opióide;

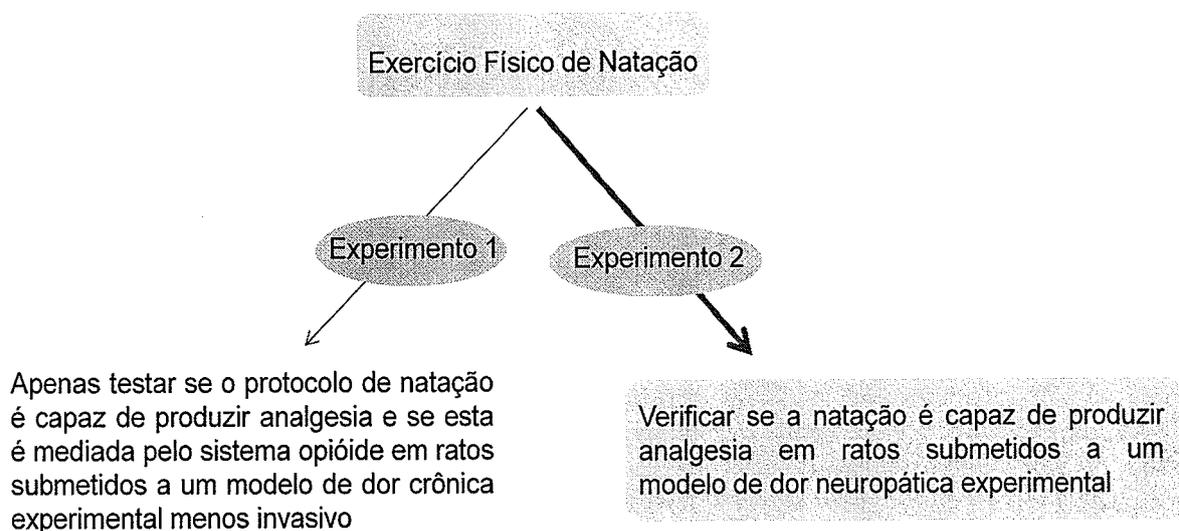
- Avaliar alodinia mecânica utilizando filamentos de Von Frey em ratos com dor neuropática crônica experimental induzida por constrição crônica do nervo ciático, submetidos à 3 semanas de natação;

- Determinar o padrão de imunorreatividade do CGRP e 5-HT no corno dorsal da medula espinhal (L4-L5) em ratos com dor neuropática crônica experimental induzida por constrição crônica do nervo ciático, submetidos à 3 semanas de natação.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos:



Experimento 1: Este experimento foi realizado apenas para verificar se o protocolo de exercício físico de natação em água aquecida (36 °C), 30 min diariamente, durante 3 semanas é capaz de produzir analgesia e se esta é mediada pelo sistema opióide endógeno ou não em ratos com dor muscular crônica experimental, para posteriormente verificar este efeito no experimento 2.

Experimento 2: Determinar o efeito da analgesia opióide induzida pelo exercício de natação em animais com dor neuropática experimental, avaliando a alodinia mecânica e as alterações imunoistoquímicas de serotonina e CGRP no corno dorsal da medula espinhal.

2.1. Experimento 1 – Efeito analgésico do protocolo de natação em ratos com dor muscular crônica experimental

2.1.1. Animais, local de origem e de realização

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos adultos com 3 meses de idade provenientes do Biotério Setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde desta Universidade. Os animais foram tratados conforme a Lei nº 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. Os animais foram mantidos em caixas padrão do biotério e receberam ração e água “*ad libitum*” permanecendo em ciclo claro/escuro 12 horas e temperatura controlada a 22°C.

2.1.2. Modelo de dor muscular crônica de Sluka (2001) para estudar o efeito analgésico do protocolo de natação

Os animais foram anestesiados com halotano (Cristália, Brasil) e posicionados em decúbito dorsal para a administração de injeção de solução de salina ácida (pH 4.0; 0,1 mL por injeção) no músculo gastrocnêmio do

membro posterior esquerdo do animal. Este é um modelo de dor não inflamatório que produz hiperalgesia e alodinia prolongada sem apresentar lesão significativa no tecido muscular (SLUKA, 2001). Estes efeitos não ocorrem após a primeira injeção, por isso, são necessárias repetidas injeções intramusculares com intervalos de 5 dias entre elas até o final do experimento, totalizando 6 injeções.

2.1.3 Naloxona

Naloxona, um antagonista opióide, foi utilizado para testar se receptores opióides estavam envolvidos na analgesia induzida pelo exercício físico (BOUIX, *et al.*, 1996; SINGH, *et al.*, 2004). Naloxona (Cristália, Brasil) dissolvido em solução salina, foi administrado (10 mg/kg subcutâneo) nos animais dos grupos 3 e 4, 30 min antes do exercício.

2.1.4. Grupos experimentais

Os ratos foram divididos em 4 grupos com 6 ratos adultos em cada grupo:

Grupo 1: ratos com dor muscular submetidos a exercício físico;

Grupo 2: ratos com dor muscular sedentários;

Grupo 3: ratos com dor muscular submetidos a exercício físico e administração de naloxona 30 min antes do exercício;

Grupo 4: ratos com dor muscular sedentários e administração de naloxona.

2.1.5. Avaliação da alodinia mecânica

A alodinia mecânica foi avaliada através de filamentos de Von Frey (North Coast Medical, Inc., EUA). Os animais foram colocados individualmente em uma caixa (12 x 20 x 20 cm) com tela no fundo (Figura 10A), após 10 min, de adaptação ao ambiente, foram utilizados filamentos de Von Frey que variaram de 10 g a 100 g (Figura 10B) aplicados em ordem crescente de força na superfície do terço médio da região plantar do membro posterior do animal (Figuras 10 C e 10 D). A adaptação foi realizada todos os dias, durante as 3 semanas, antes de cada teste. A aplicação de cada filamento foi realizada três vezes consecutivas com duração de 3 s cada. A resposta positiva foi considerada quando o animal realizou movimento de retirada do membro posterior após o estímulo mecânico, não foram consideradas respostas positivas de retirada aquelas seguida de caminhada. Foi registrada a menor força capaz de gerar uma resposta de retirada da pata sob o estímulo mecânico. Diminuição da alodinia mecânica foi considerada quando houve diminuição do limiar de retirada frente ao estímulo mecânico (BEMENT, 2005). Essa avaliação foi realizada todos os dias, durante as 3 semanas, duas vezes ao dia (pré- e pós-exercício).

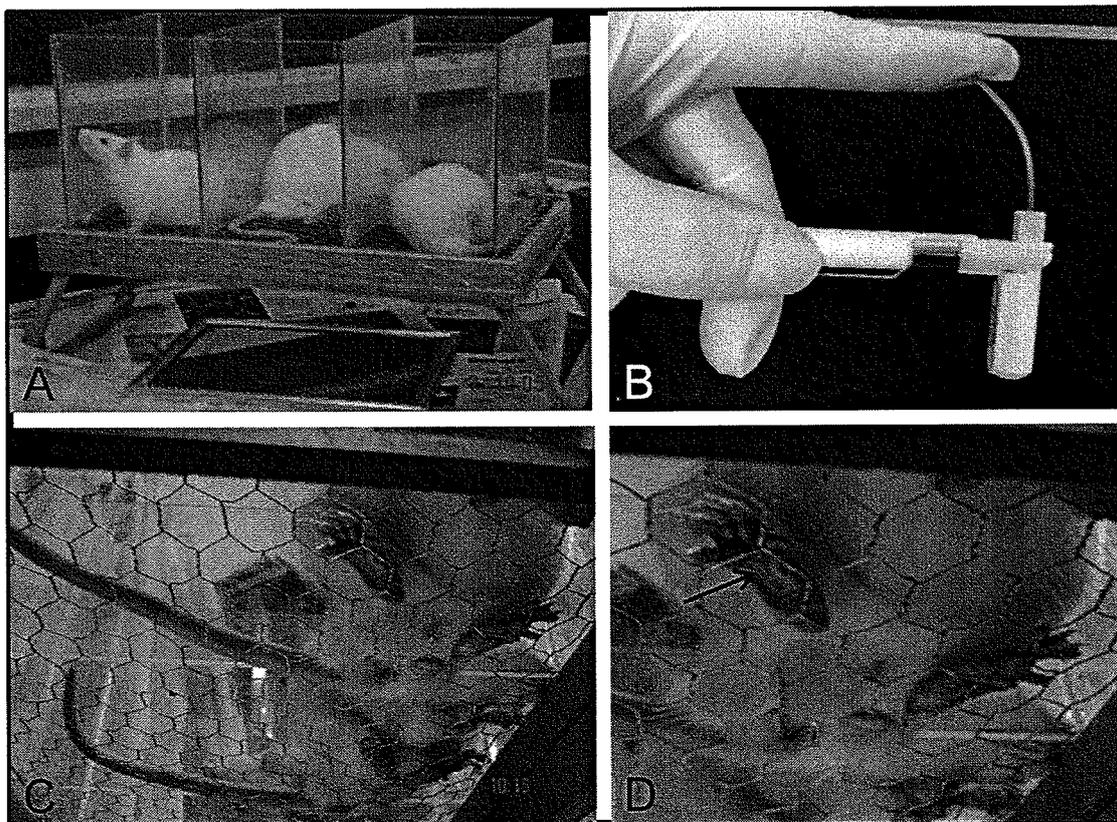


Figura 10: A: Local onde os animais foram colocados para avaliação comportamental; B: Filamento de Von Frey; C e D: Região plantar do membro posterior onde foi aplicado o Filamento de Von Frey.

2.1.6. Exercício Físico

Todos os animais foram previamente adaptados ao treinamento, para reduzir o estresse ao novo ambiente e ao exercício, porém sem promover alterações fisiológicas relacionadas ao treinamento físico (GOBATTO, 2001). Os animais foram colocados no tanque com água aquecida a 35-36 °C (Figura 11A), permanecendo por um período de 10 min por dia durante 5 dias. A água foi aquecida por um aquecedor submersível automático (ViaAqua, China) e mantida a mesma temperatura usando um termostato (ViaAqua, China).

Os grupos 1 e 3, descritos anteriormente, foram submetidos a um protocolo de exercício de natação de 30 min diariamente durante um período de 3 semanas (DEY, 1992). Os animais foram treinados em um tanque de vidro (1 m x 60 cm x 20 cm) (Figura 11A) com água a uma altura de 40 cm (Figura 11B), aquecida à 35-36 °C. Os grupos 2 e 4 descritos anteriormente, não foram submetidos ao protocolo de exercício de natação, entretanto, foram colocados no tanque com água a 1 cm de altura (Figura 11C), aquecida a 35-36 °C por 30 min diariamente, durante 3 semanas.

Todos os animais foram submetidos ao mesmo ambiente (tanque com água aquecida), pelo mesmo período de tempo (30 min diariamente) recebendo, assim, os mesmos estímulos e manipulações, minimizando seus efeitos.

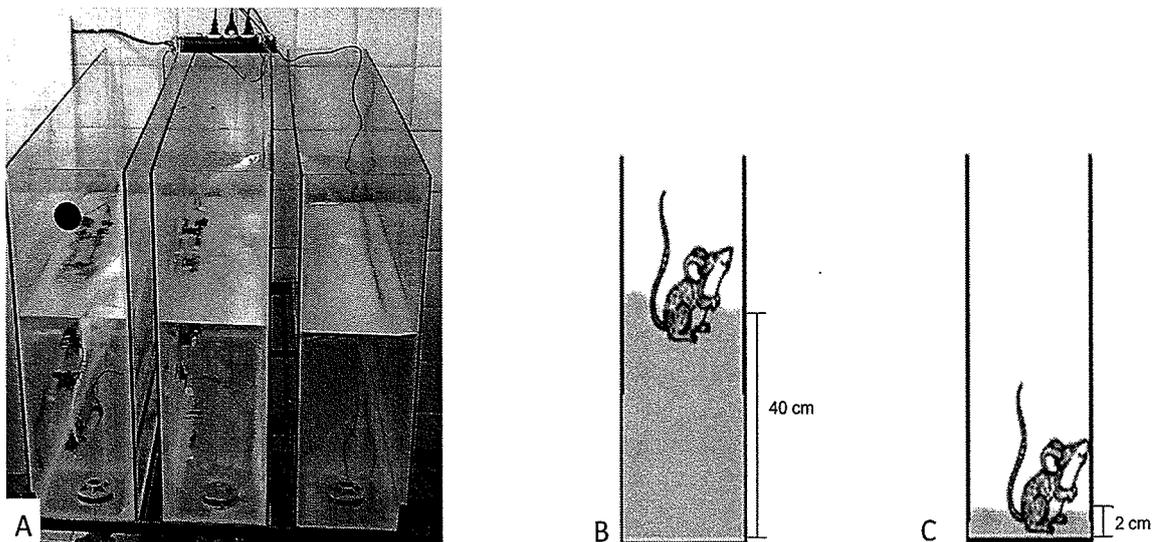


Figura 11: A) Tanque com água aquecida para natação dos ratos. B) Desenho esquemático dos grupos 1 e 3 submetidos à natação. C) Desenho esquemático dos grupos 2 e 4 sedentários, não realizavam exercício físico porém eram expostos ao mesmo ambiente dos demais grupos.

2.1.7. Desenho experimental

5 dias		4 horas	1º Semana Treino	2º Semana Treino	3º Semana Treino
1º Injeção Salina Ácida	2º Injeção Salina Ácida		Naloxona (grupos 3 e 4) (30 min antes do exercício) Avaliação Von Frey Natação 30 min (grupos 1 e 3) Re-avaliação Von Frey	Naloxona (grupos 3 e 4) (30 min antes do exercício) Avaliação Von Frey Natação 30 min (grupos 1 e 3) Re-avaliação Von Frey	Naloxona (grupos 3 e 4) (30 min antes do exercício) Avaliação Von Frey Natação 30 min (grupos 1 e 3) Re-avaliação Von Frey
		Início Treino	3º Injeção Salina Ácida	4º Injeção Salina Ácida	

2.1.8 Análise estatística

Os dados foram analisados usando a ANOVA (*One Way Analysis of Variance*) de duas vias para medidas repetidas, sendo as variáveis independentes *exercício* e *naloxona* e as variáveis repetidas as avaliações pré e pós exercício. As análises foram seguidas pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.2. Experimento 2 – Efeito da analgesia opióide induzida pela natação sobre a dor neuropática experimental

2.2.1. Animais, local de origem e de realização

Foram utilizados 36 ratos machos adultos com 3 meses de idade provenientes do Biotério Setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas desta Universidade. Os animais foram tratados conforme a Lei no 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. Os animais foram mantidos em caixas padrão do biotério e receberam ração e água “*ad libitum*” permanecendo em ciclo claro/escuro 12 hs e temperatura controlada a 22°C.

2.2.2. Modelo de dor neuropática de Bennett e Xie (1988)

Os animais foram anestesiados com halotano (2-4 %) (Cristália, Brasil) e posicionados em decúbito dorsal para realizar uma tricotomia da coxa direita. A intervenção cirúrgica iniciou-se pela assepsia da pele com álcool-iodado 2% seguida de uma incisão cutânea e subcutânea longitudinal do membro posterior direito, no terço médio da coxa, para expor o músculo glúteo. As fibras deste músculo foram separadas, permitindo a visualização do nervo ciático. O procedimento de constrição crônica do nervo ciático foi realizado de acordo com a técnica descrita por Bennett (1988), através de 4 ligaduras (fio sutura 4.0) em torno do nervo (Figura 12), levemente amarradas, com uma distância de 1 mm entre elas, assim o comprimento afetado do nervo foi de aproximadamente 5 mm. O grau desejado de constrição retarda, mas não interrompe totalmente a circulação do *vasa nervorum* da superfície epineural. Após o procedimento de constrição do nervo, o local de incisão foi suturado e desinfetado com solução de álcool iodado (BENNETT e XIE, 1988).

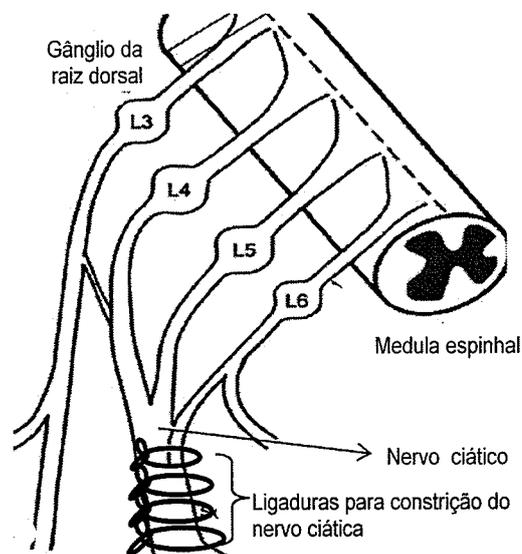


Figura 12: Desenho esquemático da constrição crônica realizada no nervo ciático direito através de 4 ligaduras no nervo.

Os animais do grupo *sham* passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, porém não tiveram seu nervo ciático ligado, desta forma não desenvolveram dor neuropática.

2.2.3. Grupos experimentais

Os ratos foram divididos em quatro grupos com 9 animais em cada grupo:

Grupo 1: ratos com dor neuropática submetidos ao exercício físico;

Grupo 2: ratos com dor neuropática sedentários;

Grupo 3: ratos *sham* submetidos ao exercício físico;

Grupo 4: ratos *sham* sedentários.

2.2.4. Avaliação da alodinia mecânica

A alodinia mecânica foi avaliada através de filamentos de Von Frey como descrita anteriormente no experimento 1. As avaliações foram realizadas três vezes por semana com intervalos de 48 hs entre elas, totalizando 15 avaliações.

2.2.5. Exercício Físico

Os animais dos grupos 1 e 3, descritos anteriormente, foram submetidos ao protocolo de natação (30 min diário durante um período de 3 semanas) Adaptado de Dey (1992), conforme descrito no experimento 1. Os grupos 2 e 4, descritos anteriormente, não foram submetidos ao protocolo de exercício de natação, entretanto, foram colocados no tanque com água a 1 cm de altura aquecida a 35-36 °C por tempo de 30 minutos diários, durante 3 semanas, conforme descrito no experimento 1.

2.2.6. Desenho experimental

1 semana	1 semana	1 ^o Semana Treino	2 ^o Semana Treino	3 ^o Semana Treino
Período de adaptação	Período de repouso	Natação 30 min diária (grupos 1 e 3) Avaliações Von Frey intervalos de 48h	Natação 30 min diária (grupos 1 e 3) Avaliações Von Frey intervalos de 48h	Natação 30 min diária (grupos 1 e 3) Avaliações Von Frey intervalos de 48h
Procedimento cirúrgico		Início Treino		

2.2.7. Obtenção do Tecido Nervoso

No 15º dia de treinamento, imediatamente após o exercício, todos os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca seguidos da análise histológica e imunoistoquímica.

2.2.8. Perfusão transcardíaca

Para o procedimento da perfusão transcardíaca, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Cristália, Brasil) intraperitoneal (0,1 mL/100 g de peso corporal). Após anestesia foi feita uma toracotomia, expondo o coração e injetado 1000 UI de heparina sódica (Cristália, Brasil) no ventrículo esquerdo para evitar a formação de coágulos na circulação. Em seguida foi feita uma incisão nesse mesmo ventrículo, pela qual foi inserida uma cânula da bomba de perfusão (Milan, Brasil; 40 mL/min). Após a colocação da cânula no ventrículo esquerdo foi feita uma incisão no átrio direito, para que todo o sistema sanguíneo e de perfusão tivesse uma saída, imediatamente se iniciou a perfusão. Inicialmente foi perfundida uma solução salina (300 mL) para lavagem da árvore vascular e, posteriormente, uma solução fixadora (300 mL) de paraformaldeído 4% (Reagen, Brasil) diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4.

2.2.9. Análise histológica

Após a perfusão transcardíaca, a região lombar da medula espinhal foi retirada e pós-fixada na mesma solução fixadora utilizada na perfusão por 4 horas a temperatura ambiente e logo em seguida crioprotegida em soluções crescentes (15 e 30%) de sacarose (Synth, Brasil) diluídas em TF 0,1M até afundarem (normalmente *overnight*) a 4 °C.

Após a crioproteção as amostras de tecido foram congeladas em isopentano (Vetec, Brasil). resfriado em nitrogênio líquido para serem cortados em uma espessura de 40 µm em criostato à -20 °C (Leica, Germany).

Alguns cortes foram coletados diretamente em lâminas gelatinizadas para visualização da área a ser estudada utilizando técnica de hematoxilina e eosina (GAMBLE e BRANCROFT, 2008).

2.2.10. Detecção Imunoistoquímica

O material seccionado em criostato (Leica, Germany) e coletado "*free floating*" foi lavado em tampão fosfato salina (PBS) para a remoção completa do meio de embebição. Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, os cortes foram tratados com uma solução de peróxido de hidrogênio 3% durante 30 min sob agitação constante e temperatura ambiente. Para bloquear as ligações inespecíficas foi realizada uma pré-incubação dos cortes em uma solução contendo: albumina 3% (Sigma, EUA) diluída em Triton X-100 0,4% (Sigma, EUA) em PBS (PBS-TX), permanecendo em um agitador orbital

(Fanem, Brasil) sendo pré-incubados por 30 min à temperatura ambiente e em agitação contínua. Ao término deste período, os cortes foram incubados com o anticorpo primário. Os cortes foram incubados em uma solução de anticorpo policlonal anti-CGRP (1:2000; Sigma, USA) ou de anti-serotonina (1:3000; Sigma, EUA) diluído em PBS-Tx, *overnight* a 4° C em agitação contínua. Após, os cortes foram lavados em PBS-Tx, e depois incubados com o segundo anticorpo anti-coelho (Sigma, EUA) 1:50 diluídos em PBS-Tx por 2 hs, à temperatura ambiente, como as etapas posteriores do procedimento. Os cortes foram lavados novamente com PBS. Posteriormente os cortes foram incubados no complexo PAP (peroxidase anti-peroxidase; Sigma, EUA), 1:500 por 2 hs. Os cortes foram novamente lavados em PBS. Para obtermos a visualização da reação, os cortes foram tratados com tetrahidrocloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma, EUA) 0,06% diluído em PBS. Após 10 min foi acrescentado H₂O₂ 10% à solução anterior, em uma concentração de 1 µL/mL de solução. Os cortes permaneceram nesta solução por 10 min. Após, foram cuidadosamente lavados em PBS e montados em lâminas previamente gelatinizadas. Posteriormente foram desidratados em soluções crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e cobertos com Permount e lamínulas.

O procedimento imunistoquímico dos diferentes grupos experimentais foi realizado no mesmo momento e com as mesmas soluções, no intuito de evitarem-se variáveis inerentes ao procedimento. Para controle da técnica foi omitido o primeiro anticorpo, o qual foi substituído por PBS (Xavier, *et al.*, 2005).

2.2.11. Densitometria óptica

Para medir o produto de reação imunoistoquímica da 5-HT e do CGRP foi realizada a densitometria óptica regional (RASIA-FILHO *et al.*, 2002; SWAROWSKY *et al.*, 2005). A intensidade da reação foi medida através de uma análise semi-quantitativa por densitometria óptica utilizando-se um microscópio Nikon Eclipse E-600 (100x) acoplado a uma câmara digital (DCE-2, China). A imagem foi processada e analisada com um software (*Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA*). Foram capturadas 10 imagens de cada rato, as quais foram digitalizadas e convertidas em escala de cinza (0-255 níveis de cinza) e a densidade óptica foi medida. As medidas foram obtidas colocando-se uma área de interesse amostral (AOI) sobre a região analisada (Figura 13).

Todas as condições de luz e magnificações foram mantidas constantes entre as secções e áreas analisadas, os animais foram todos sacrificados no mesmo dia e sob as mesmas condições de umidade e temperatura ambiente, e processados com as mesmas soluções para evitar vieses na análise. A coloração de fundo de um local não reativo na lâmina foi determinada e utilizada para corrigir as medidas da densidade óptica. A densidade óptica das áreas de interesse (AOI) foi calculada usando a seguinte fórmula: $[10/\log(255/255 - \text{valor pixel})]$. Os resultados obtidos representam as médias de todos os pixels na área escolhida. Coloração coletada previamente foi subtraída das medidas de densidade óptica utilizando valores médios de áreas onde o anticorpo primário foi omitido (XAVIER, *et al.*, 2005). Áreas retangulares de interesse foram definidas para cada região (ver figura 13) a barra de calibração

onde está a AOI mediu $279 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ e foi colocada sobre as lâminas I e II do corno dorsal da medula lombar ipsilateral a lesão.

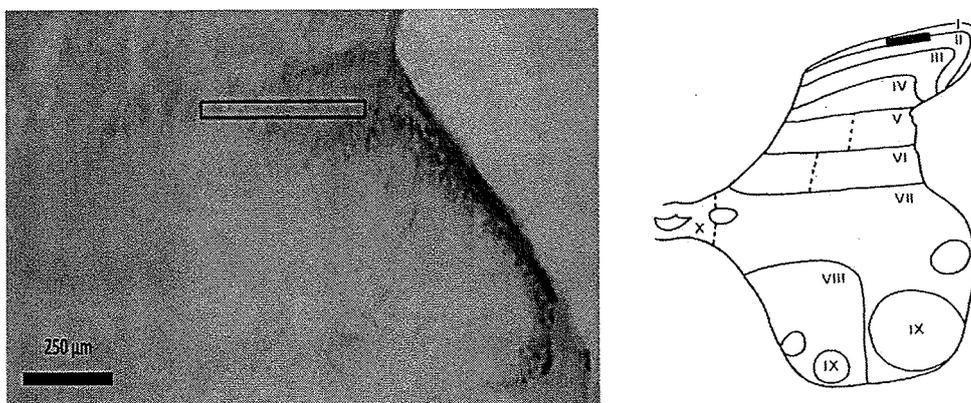


Figura 13: Corte transversal da medula lombar de rato com a representação da AOI nas lâminas I e II do corno dorsal para densitometria óptica regional utilizando a técnica de imunistoquímica para CGRP. A direita, desenho esquemático da medula espinhal de rato, localização da AOI na lâmina II (adaptado de FIELDS, 1987). A mesma localização da AOI foi utilizada para analisar a imunorreatividade a 5-HT.

2.2.12. Análise estatística

Os dados do comportamento foram analisados usando a ANOVA de duas vias para medidas repetidas, sendo as variáveis independentes lesão e exercício e as variáveis repetidas os dias de avaliação e avaliações pré e pós exercício. Os dados da imunistoquímica para CGRP e para 5-HT foram analisados usando a ANOVA de duas vias. As análises foram seguidas pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1

Com o intuito de investigar se o protocolo de exercício físico de natação foi capaz de produzir analgesia no modelo de dor muscular crônica experimental, os animais foram avaliados diariamente pré- e pós-exercício durante as 3 semanas de treinamento. Foi considerada a diminuição da alodinia mecânica quando houve aumento no limiar de retirada frente ao estímulo mecânico com filamentos de Von Frey.

Todos os animais apresentaram o mesmo grau de alodinia mecânica desenvolvida pelo modelo de dor muscular crônica experimental, pois não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pré-exercício entre os grupos (Figura 14).

Os animais do grupo exerc controle (grupo de animais com dor muscular, exercitados e sem administração de naloxona) apresentaram diminuição da alodinia mecânica após a natação, observado através do aumento significativo ($p < 0,05$) das médias pós-exercício quando comparada com a média pré-exercício deste mesmo grupo (Figura 14). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias pré- e pós-exercício (Figura 14).

O grupo de animais exerc naloxona (grupo de animais com dor muscular, exercitados e com administração de naloxona) não apresentou diminuição da alodinia mecânica após a natação, pois as médias pré-exercício

não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às médias pós-exercício deste mesmo grupo. Este resultado indica que a injeção de naloxona reverteu o efeito do pós-exercício, pois houve também uma diferença significativa ($p < 0,05$) dos valores pós-exercício entre os grupos exercitados com administração de naloxona daqueles sem administração de naloxona (Figura 14).

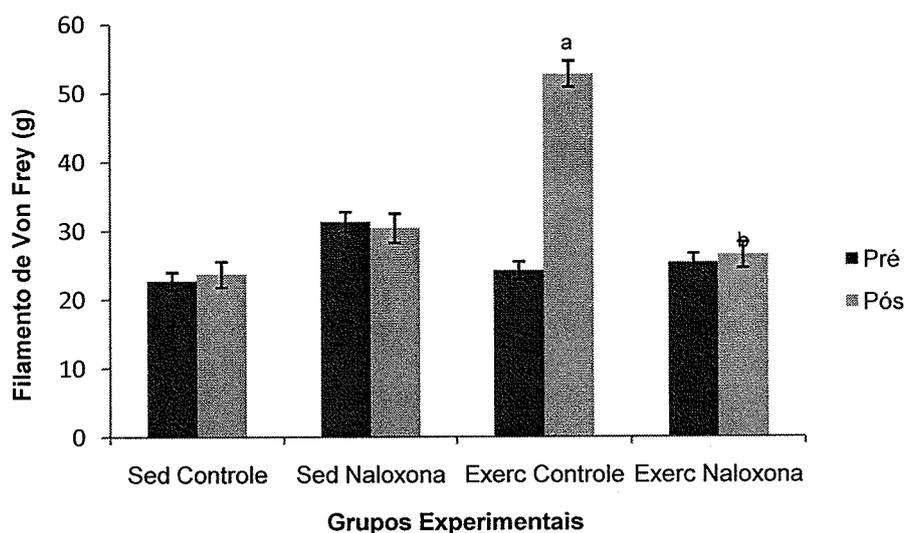


Figura 14: Experimento 1- Respostas de ratos, submetidos à lesão muscular crônica experimental e natação por três semanas, ao teste de Von Frey com filamentos que variaram de 10 a 60 g. Sed Controle (grupo de animais sedentários sem administração de naloxona); Sed Naloxona (grupo de animais sedentários com administração de naloxona); Exerc Controle (grupo de animais exercitados sem administração de naloxona); Exerc Naloxona (grupo de animais exercitados com administração de naloxona). O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a força imposta pelos filamentos de Von Frey. As barras representam as médias dos grupos pré-exercício (preto) e pós-exercício (cinza). a: indica diferença significativa quando comparada as médias pré- e pós-exercício do grupo exercitado controle, assim como quando comparada as médias pós-exercício do grupo exercitado controle em relação aos valores pré- e pós-exercício dos demais grupos. b: indica diferença significativa quando comparadas as médias do grupo exercitado naloxona pós-exercício em relação ao valor obtido pós-exercício do grupo exercitado controle. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. $n = 6$ animais por grupo.

3.2. Experimento 2

3.2.1. Resultado Avaliação Alodinia Mecânica

Com o intuito de investigar se a analgesia opióide endógena induzida pela natação, observada nos resultados do experimento 1 é capaz de diminuir a alodinia mecânica causada pelo modelo de dor neuropática crônica experimental, os animais foram avaliados 3 vezes por semana totalizando 9 avaliações, durante as 3 semanas de treinamento. A resposta foi considerada positiva quando o animal realizou movimento de retirada do membro posterior após o estímulo mecânico realizado com o filamento de Von Frey. Foi considerada a diminuição da alodinia mecânica quando houve aumento no limiar de retirada frente ao estímulo com filamentos de Von Frey.

O teste de Von Frey mostrou que, os animais com constrição crônica do nervo ciático apresentaram respostas positivas a filamentos significativamente menores quando comparada aos animais sem constrição do nervo (Figura 15). Isso indica que estes animais desenvolveram alodinia mecânica após a constrição do nervo ciático. Contudo, os animais com constrição do nervo ciático exercitados não apresentaram diferença significativa quando comparados com os animais com constrição do nervo ciático sedentários, demonstrado que o exercício não foi capaz de reverter o quadro de alodinia desenvolvido pelo modelo de dor neuropática nestes animais (Figura 15).

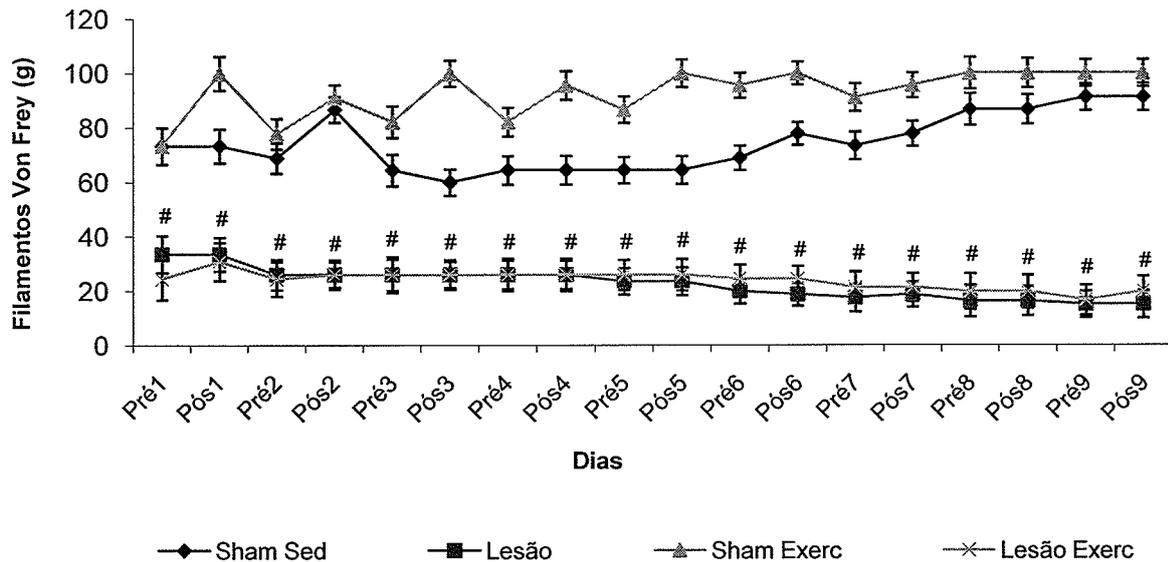


Figura 15: Experimento 2 –Respostas de ratos, submetidos à constrição crônica ou manipulação do nervo ciático e natação por três semanas, ao teste de Von Frey com filamentos que variaram de 10 a 100 g. Sham Sed (grupo de animais sedentários sem constrição crônica do nervo ciático; Lesão (grupo de animais sedentários com constrição crônica do nervo ciático); Sham Exerc (grupo de animais exercitados sem constrição crônica do nervo ciático); Lesão Exerc (grupo de animais exercitados com constrição crônica do nervo ciático). O eixo da abscissa representa 9 avaliações pré- e pós-exercício e o eixo da ordenada representa a força imposta pelos filamentos de Von Frey. As linhas representam as médias dos grupos pré e pós-exercício. #: indica diferença significativa quando comparado os valores obtidos pré- e pós-exercício entre os grupos lesão e sham. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. $n = 9$ animais por grupo.

3.2.2. Resultados Imunoistoquímicos

Foi analisada, por densitometria óptica, a imunorreatividade de serotonina e de CGRP nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos submetidos à constrição crônica ou manipulação do nervo ciático e natação por três semanas no lado ipsilateral à lesão.

3.2.2.1. Resultado Imunoistoquímico – serotonina

A análise dos resultados da densitometria óptica das lâminas I e II do corno dorsal da medula espinal lombar no lado ipsilateral à constrição crônica ou manipulação do nervo ciático, mediante o emprego de ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Duncan, não mostrou alterações significantivas ($p < 0,05$) entre os grupos dos animais lesão (grupos de animais com constrição do nervo ciático) sedentário e exercitado (Figura 16), assim como entre grupos dos animais *sham* (grupos de animais sem constrição do nervo ciático) sedentário e exercitado (Figura 16). No entanto, o grupo lesão sedentário (grupo de animais com constrição do nervo ciático, sedentário) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) da imunorreatividade de serotonina em relação aos grupos *sham* (grupo de animais sem constrição do nervo ciático) sedentário e exercitado (Figura 16). O grupo lesão exercitado (grupo de animais com constrição do nervo ciático, exercitados) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) da imunexpressão de serotonina em relação ao grupo *sham* sedentário (Figura 16).

Após a constrição crônica do nervo ciático, houve um aumento da imunorreatividade a serotonina nas lâminas I e II da medula espinhal do lado ipsilateral a lesão na região que corresponde à terminações aferentes que foram lesionadas (somatotopia) (Figura 17).

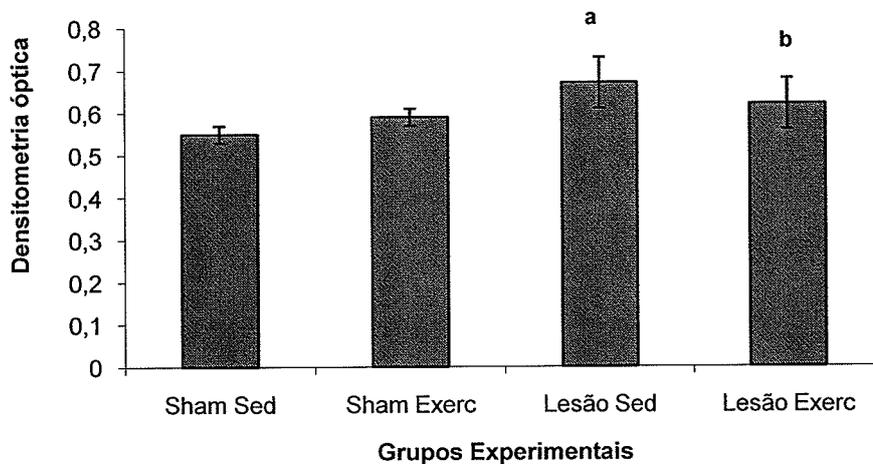


Figura 16: Experimento 2 - Medidas de densitometria óptica da imunorreatividade a serotonina no corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos submetidos à constrição crônica ou manipulação do nervo ciático e natação por três semanas. Sham Sed (grupo de animais sedentários sem constrição crônica do nervo ciático; Lesão (grupo de animais sedentários com constrição crônica do nervo ciático); Sham Exerc (grupo de animais exercitados sem constrição crônica do nervo ciático); Lesão Exerc (grupo de animais exercitados com constrição crônica do nervo ciático). O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a densidade óptica. As colunas representam as médias de imunorreatividade a serotonina. a: indica diferença significativa quando comparado o grupo lesão sed aos grupos *sham* (sedentário e exercitado). b: indica diferença significativa quando comparado o grupo lesão exercitado ao grupo *sham* sedentário. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. $n = 9$ animais por grupo.

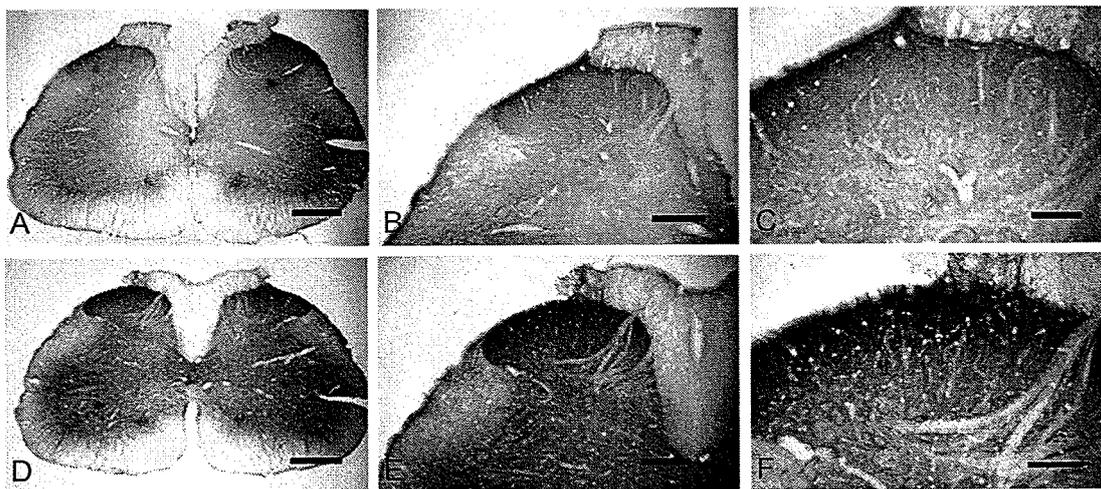


Figura 17: Experimento 2 - Imunorreatividade a serotonina no corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos submetidos à constrição crônica ou manipulação do nervo ciático. Grupo *sham* (grupo de animais sem constrição crônica do nervo ciático): A, B e C; e grupo lesão (grupo de animais com constrição crônica do nervo ciático): D, E e F. Barra de calibração = A e D: 200 μm ; B e E: 100 μm ; C e F: 50 μm .

3.2.2.2. Resultado Imunoistoquímico – CGRP

A análise dos resultados da densitometria óptica das lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal lombar no lado ipsilateral à constrição crônica ou manipulação do nervo ciático, mediante o emprego de ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Duncan, não mostrou alterações significativas ($p < 0,05$) entre os grupos dos animais lesão (grupos de animais com constrição do nervo ciático) sedentário e exercitado (Figura 18). Entretanto, estes apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da imunorreatividade de CGRP em relação aos grupos *sham* (grupos de animais sem constrição do nervo ciático) sedentário e exercitado (Figura 18). Os grupos *sham* (grupos de animais sem constrição do nervo ciático) sedentário e exercitado apresentaram

diferenças entre si, com um aumento significativo ($p < 0,05$) da imunorreatividade de CGRP no grupo *sham* sedentário (Figura 18).

Após a constrição crônica do nervo ciático, houve uma diminuição da imunorreatividade ao CGRP nas lâminas I e II da medula espinhal do lado ipsilateral a lesão na região que corresponde as terminações aferentes que foram lesionadas (somatotopia) (Figura 19).

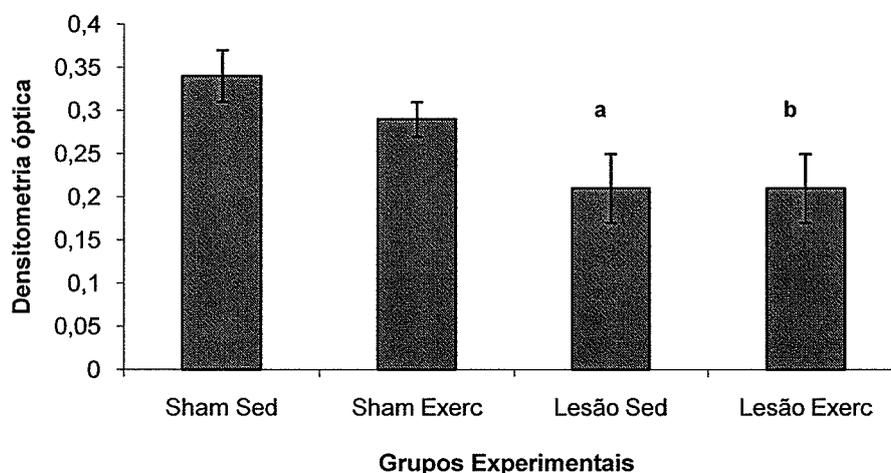


Figura 18: Experimento 2 - Medidas de densitometria óptica da imunorreatividade ao CGRP no corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos submetidos à constrição crônica ou manipulação do nervo ciático e natação por três semanas. Sham Sed (grupo de animais sedentários sem constrição crônica do nervo ciático; Lesão (grupo de animais sedentários com constrição crônica do nervo ciático); Sham Exerc (grupo de animais exercitados sem constrição crônica do nervo ciático); Lesão Exerc (grupo de animais exercitados com constrição crônica do nervo ciático). O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a densidade óptica. As colunas representam as médias de imunorreatividade ao CGRP. a: indica diferença significativa quando comparado o grupo lesão sed ao grupo *sham* sedentário. b: indica diferença significativa quando comparado o grupo lesão exercitado aos grupos *sham* (sedentário e exercitado). ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. $n = 9$ animais por grupo.

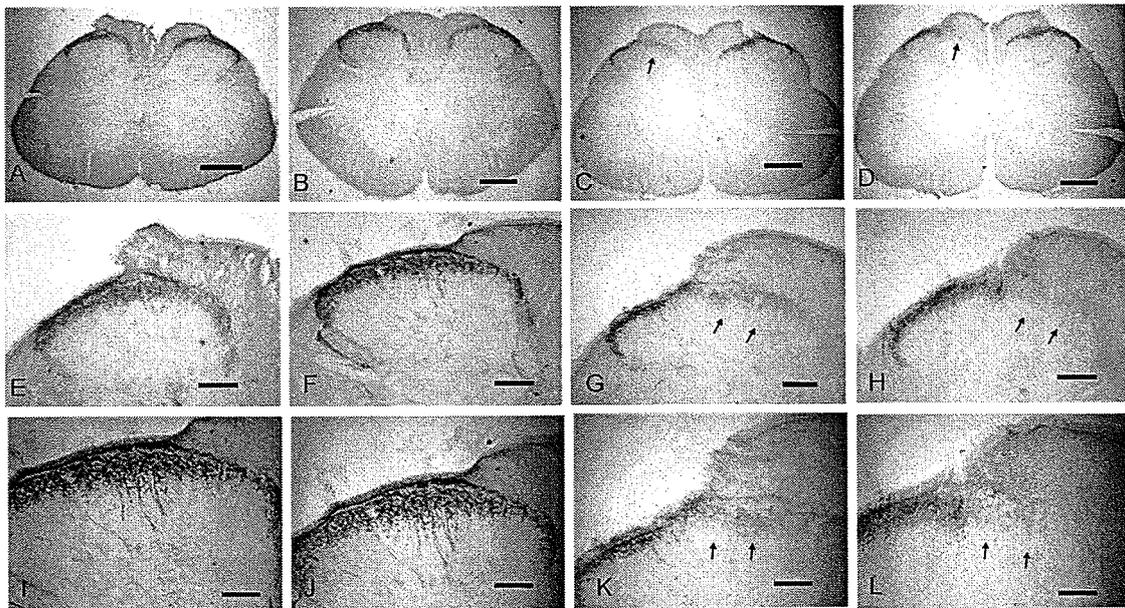


Figura 19: Experimento 2 - Imunorreatividade ao CGRP no corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos submetidos à constrição crônica ou manipulação do nervo ciático e natação por três semanas. Grupo *sham* sedentário: A, E e I (grupo de animais sedentários sem constrição crônica do nervo ciático); grupo *sham* exercitado: B, F e J (grupo de animais exercitados sem constrição crônica do nervo ciático); grupo lesão sedentário : C, G e K (grupo de animais sedentários com constrição crônica do nervo ciático); grupo lesão exercitado: D, H e L (grupo de animais exercitados com constrição crônica do nervo ciático). Barra de calibração = A, B, C e D: 200 μ m; B, F, G e H: 100 μ m; I, J, K e L: 50 μ m.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com o intuito de investigar o efeito da analgesia opióide induzida pelo exercício físico sobre a dor neuropática experimental em ratos machos adultos.

Na primeira etapa buscamos testar o efeito analgésico do protocolo de natação. Para isso, animais com dor muscular crônica experimental (um modelo de dor crônica menos invasivo do que o de dor neuropática) foram submetidos a um protocolo de natação e foram avaliados com filamentos de Von Frey diariamente durante 3 semanas de treinamento. Para testar o envolvimento opióide endógeno foi administrado naloxona, um antagonista opióide, em dois grupos experimentais.

Em relação aos resultados do primeiro experimento, todos os animais desenvolveram o mesmo grau de alodinia mecânica induzida pelo modelo de dor muscular crônica experimental. Os animais do grupo exerc controle (grupo de animais com dor muscular, exercitados e sem administração de naloxona) apresentaram diminuição significativa da alodinia mecânica após a natação. No entanto, o grupo de animais exerc naloxona (grupo de animais com dor muscular, exercitados e com administração de naloxona) não apresentou diminuição significativa da alodinia mecânica após a natação. Estes resultados indicam que a administração de naloxona impediu o efeito analgésico induzido pela natação, demonstrando a participação do sistema opióide endógeno neste sistema antinociceptivo. Esses resultados são semelhantes aqueles encontrados por Bemment e Sluka (2005) que testaram o efeito analgésico

opióide induzido pelo exercício de caminhada em esteira sobre a dor muscular experimental em ratos, esses autores observaram uma diminuição da alodinia mecânica após o exercício a qual foi inibida pela administração da naloxona. Estes resultados corroboram com os apresentados neste estudo e ambos sugerem que opióides endógenos são liberados durante o exercício e estão envolvidos na produção de analgesia após o exercício. Outros estudos prévios também demonstraram que o exercício físico aumenta os níveis circulantes de opióides endógenos (SHYU *et al.*, 1982; CARMODY e COOPER, 1987; DROSTE *et al.*, 1991; GOLDFARB e JAMURTAS, 1997; KANAREK *et al.*, 1998). Entretanto, poucas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de estudar o efeito analgésico produzido pelo exercício, em especial a natação, em modelos animais com alodinia e hiperalgesia.

O protocolo de exercício utilizado neste estudo foi baseado em um estudo realizado por Dey e colaboradores (1992). Estes autores encontraram um aumento na síntese e utilização da serotonina no tronco encefálico após 4 semanas de natação em água aquecida. Estudos prévios demonstram que a serotonina é um dos neurotransmissores envolvidos na modulação opióide com uma participação importante na modulação do circuito nociceptivo na medula espinhal (BARBEAU e ROSSIGNOL, 1990; CROWN e GRAU, 2005). Outros estudos também demonstram que um aumento de serotonina foi capaz de inibir a sensação de dor em ratos (LeBARS, 1988; BARDIN *et al.*, 1997). Isto sugere que a serotonina pode ter um papel na modulação da informação nociceptiva encontrada neste estudo.

Outro componente envolvido na produção de analgesia é o estresse causado pela natação. Um estudo realizado por Mogil e colaboradores (1996)

testou o efeito da analgesia induzida pelo estresse da natação e indicou que os mecanismos responsáveis podem ser mediados por sistemas opióide e não opióide, sendo que, animais que nadaram em água fria (15 °C) por curto período de tempo (45 s) produziram analgesia opióide e aqueles que nadaram em água aquecida (32 °C) por longo período de tempo (7 min) produziram analgesia não opióide. Carmody e Cooper (1987) verificaram a presença de analgesia, abolida pela naloxona, usando um modelo de lesão aguda, após o estresse da natação. No presente trabalho, foi encontrada analgesia nos animais exercitados sem administração de naloxona, no entanto o grupo exercitado com administração de naloxona reverteu esse resultado. Indicando um envolvimento do sistema opióide neste tipo de exercício.

No intuito de minimizar o efeito causado pelo estresse nesse estudo, o grupo controle foi colocado no mesmo tanque, com água aquecida a mesma temperatura, porém a coluna de água foi de 2 cm de altura (Figura 11), pelo mesmo tempo em que os animais do grupo exercitado nadaram. Desta forma, eles passaram pelos mesmos ambientes e foram submetidos às mesmas manipulações, exceto o exercício físico.

Finalizada a primeira etapa deste estudo, se fez necessário conhecer se analgesia opióide endógena, demonstrada pela natação no primeiro estudo, é capaz de agir desta mesma forma no modelo de dor neuropática. Além disso, torna-se importante estudar a presença da serotonina no circuito medular, uma vez que esta tem participação na modulação da informação nociceptiva e poderia estar mediando a analgesia via opióides.

Dessa forma, a segunda etapa foi direcionada para o estudo dos efeitos analgésicos induzidos pela natação sobre a dor neuropática e, além disso, verificar as possíveis alterações na imunorreatividade à serotonina e ao CGRP no corno dorsal da medula espinhal a nível lombar.

A lesão dos nervos periféricos está normalmente associada com o desenvolvimento de dor neuropática, a qual se manifesta por alodinia, hiperalgesia e dor espontânea (WOOLF e MANNIONN, 1999; WALL e MELZACK, 2006). Os mecanismos envolvidos neste processo são diversos, incluindo alterações periféricas no neurônio aferente primário e plasticidade central (WOOLF e MANNIONN, 1999; WALL e MELZACK, 2006).

A constrição crônica do nervo ciático resulta em alodinia mecânica (BENNETT e XIE, 1988), este estudo confirmou estes achados uma vez que, na avaliação com filamentos de Von Frey, os grupos lesão (grupos de animais com constrição crônica do nervo ciático), sedentário e exercitado, apresentaram respostas positivas a filamentos significativamente menores quando comparada aos animais dos grupos *sham* (grupos de animais sem constrição crônica do nervo ciático), sedentário e exercitado. No presente estudo, a alodinia mecânica já esteve presente no primeiro dia pós operatório, e se manteve ao longo das 3 semanas de avaliação, semelhante a outros trabalhos que usaram este mesmo modelo (BENNETT e XIE, 1988; KUPERS *et al.*, 1992).

Acredita-se que os mecanismos envolvidos na produção de alodinia, hiperalgesia e dor espontânea, que são manifestações da dor neuropática, estejam relacionados com as alterações periféricas e centrais que ocorrem após a lesão do nervo periférico.

As alterações periféricas encontradas após a lesão do nervo periférico incluem um aumento de canais de sódio funcionais na membrana do axônio danificado (DEVOR, 1994; WALL e MELZACK, 2006). Com isso, desenvolve-se hipersensibilidade, atividade espontânea e geração de descargas ectópicas destes neurônios sensoriais. Ochoa e colaboradores (1982) demonstraram um aumento da atividade das fibras C nociceptivas após a lesão de nervos periféricos em humanos.

O principal neurotransmissor do aferente primário é o aminoácido excitatório glutamato. Ativação do nociceptor causa a liberação deste neurotransmissor dos terminais, os quais agem em receptores ionotrópicos AMPA e causam despolarização nos neurônios do corno dorsal. Outro receptor ionotrópico do glutamato é o NMDA, porém este se encontra bloqueado quando a membrana neuronal está em repouso. Neuropeptídeos, como a substância P, localizados nos terminais dos aferentes primários, juntamente com o glutamato são liberados, estendendo a despolarização e aumentando a concentração de cálcio intracelular. Este processo permite a ativação deste receptor aumentando a excitabilidade. Esta amplificação do sinal no SNC é conhecida como sensibilização central, a qual muda a maneira que os neurônios respondem a entradas subseqüentes (WOOLF, 1983). Ainda, a substância P é normalmente liberada por fibras C e A δ , de neurônios aferentes primários, e está envolvida na transmissão da informação nociceptiva para o SNC, porém após a lesão há uma diminuição importante da expressão de substância P por estas fibras. Entretanto, fibras A β começam a expressar este neuropeptídeo. Desta forma, estímulos inócuos ativados por fibras A β , podem causar liberação de substância P no corno dorsal e assim gerar um estado de

hipersensibilidade central que é normalmente produzida somente por ativação do nociceptor (WOOLF e MANNION, 1999).

Além disso, sabe-se que os terminais de neurônios aferentes primários são altamente ordenados na medula espinhal. Fibras A- β (mecanosensoriais) estão localizadas nas lâminas III e IV, sendo responsáveis pela transmissão de estímulos inócuos (SHORTLAND *et al.*, 1989; WOOLF *et al.*, 1992). Por outro lado, as fibras C (nociceptivas) localizam-se predominantemente nas lâminas I e II e são responsáveis pela condução de estímulos nocivos (RALSTON, 1979; SUGIURA, 1986; WOOLF *et al.*, 1992). Após lesões dos nervos periféricos essa distribuição medular das terminações sensoriais sofrem alterações que contribuem para a hipersensibilidade demonstrada neste tipo de lesão. As alterações centrais que ocorrem após a lesão das fibras C do nervo periférico incluem uma perda de terminais destas fibras na lâmina II e conseqüentemente uma migração de terminais de fibras A β para lâmina II (WOOLF *et al.*, 1992; MANNION *et al.*, 1996; WALL e MELZACK, 2006).

No presente estudo foi avaliada a atividade das fibras C, após 3 semanas de constrição crônica do nervo ciático, através da imunorreatividade ao CGRP, o qual é liberado pelo neurônio aferente primário nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal. Foi encontrada uma redução significativa na imunorreatividade ao CGRP dos grupos lesão (grupo de animais com constrição crônica do nervo ciático), com ou sem exercício, em relação aos grupos *sham* (grupo de animais sem constrição crônica do nervo ciático). Estes resultados corroboram com os achados de Kolesnicov e colaboradores (2007) que observaram uma perda de fibras C na lâmina II e uma migração de fibras A- β para lâmina II após a constrição crônica do nervo ciático, assim como em

outros estudos anteriores que também encontraram esta diminuição da atividade das fibras C na lâmina I e II do corno dorsal (MAPP *et al.*, 1993; YU, *et al.*, 1996; DOBOLYI *et al.*, 2005).

A importância funcional da migração da fibra A- β para a lâmina II, a qual normalmente recebe apenas informação nociceptiva, começa a receber informação sobre estímulos não nocivos, esta informação pode ser mal interpretada pelo SN como nocivo – um substrato anatômico para alodinia mecânica (WOOLF e DOUBELL, 1994).

O protocolo de natação utilizado neste estudo foi testado através do experimento 1 e comprovou-se um envolvimento opióide na produção de analgesia após o exercício, como observado nos resultados encontrados no experimento 1. Entretanto, esse mecanismo antinociceptivo não foi eficaz na dor neuropática uma vez que os animais com lesão do nervo periférico, grupos sedentário e exercitado, não apresentaram diferenças significativas entre si na avaliação com filamentos de Von Frey. Desta forma, mesmo havendo uma possível liberação de opióides endógenos após o exercício, não foi possível estabelecer um circuito eficaz para produção da analgesia neste modelo. Este resultado pode ser explicado, em parte, pelas alterações periféricas e centrais encontradas após a constrição crônica do nervo ciático. Essas alterações incluem aumento da excitabilidade e atividade espontânea do aferente primário que podem ser causadas pela liberação de mediadores químicos liberados após a lesão assim (sensibilização periférica), assim como, a perda de fibras C e a migração de fibras A β para lâmina II (sensibilização central) (BARON e SAGUER, 1993; WOOLF e DOUBELL, 1994; WOOLF E MANNION, 1999; WALL e MELZACK, 2006), modificando as respostas para produção de

analgesia. Porém são necessários mais estudos para esclarecer os mecanismos que impedem a produção de analgesia mediada pelo sistema opióide endógeno induzido pelo exercício.

Além disso, o protocolo de natação utilizado no presente estudo foi baseado em um trabalho realizado por Dey e colaboradores (1992), que encontraram um aumento na síntese e utilização da serotonina no tronco encefálico após o exercício. Assim, parece plausível a hipótese de que este protocolo de natação poderia induzir um aumento da serotonina na medula espinhal e assim participar da modulação da informação nociceptiva (FIELDS e BASBAUM, 1978; WILLIS e WESTLUND, 1997; PRADO e FAGANELLO, 2000).

Na tentativa de estudar os possíveis mecanismos de modulação da dor, foi analisado a imunorreatividade à serotonina na medula espinhal. Estudos demonstram que a serotonina tem um papel importante na modulação da dor ao nível medular (BASBAUM *et al.*, 1977; BASBAUM; FIELDS, 1984; DESEURE, *et al.*, 2002; BARDIN, *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2004; WALL e MELZACK, 2006). O presente estudo demonstrou aumento da imunorreatividade à serotonina no corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos submetidos à constrição do nervo ciático, sedentários e exercitados. Resultados prévios concordam em parte com os encontrados neste estudo, pois um aumento da serotonina foi encontrada nos animais com lesão de nervo periférico. Entretanto, este aumento à serotonina não foi eficaz para diminuição da alodinia mecânica. Além disso, não houve um aumento significativo de serotonina entre os animais dos grupos *sham* (sedentário e exercitado) assim como, entre os animais dos grupos com lesão do nervo periférico (sedentário e exercitado), sugerindo que o exercício por si só não promoveu um aumento da

serotonina no corno dorsal da medula espinhal. Isto parece indicar que a alteração na imunorreatividade destes neurônios é decorrente da lesão periférica e não do exercício físico. Desta forma, a serotonina possivelmente liberada pelo tronco encefálico, como demonstrado por Dey e colaboradores (1992) neste programa de treinamento em água, não está participando do circuito medular de modulação da informação nociceptiva através da ativação de interneurônios opióides. Os quais agiriam sobre receptores localizados no aferente primário e no neurônio de projeção, modulando essa transmissão.

Embora tenhamos demonstrado no primeiro experimento que este protocolo de natação induz analgesia opióide, este mesmo mecanismo pode não ter ação sobre o modelo de dor neuropática, uma vez que neste há retração das fibras C do neurônio aferente primário e seus receptores opióides deixam de ter ação sobre a modulação nociceptiva neste circuito, não diminuindo a alodinia mecânica encontrada neste modelo (WOOLF e MANNION, 1999; BENNETT, 1999; ZIMMERMANN, 2001; KOLESNIKOV *et al.*, 2007). Os receptores opióides localizados no neurônio de projeção podem estar participando da modulação, entretanto a modulação via aferente primário deve ter um papel importante uma vez que a alteração neste circuito resulte na ausência de analgesia e a ativação do neurônio de projeção seja neste modelo dependente principalmente da ativação da fibra proveniente das lâminas III e IV (WOOLF e MANNION, 1999; ZIMMERMANN, 2001).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos a partir dos estudos comportamental e imunoistoquímico dos efeitos da natação sobre os modelos experimentais de dor muscular e neuropática nos permitem obter as seguintes conclusões:

Há um envolvimento do sistema opióide endógeno no protocolo de natação utilizado neste estudo e este foi capaz de diminuir a alodinia mecânica nos ratos com dor muscular.

O mesmo protocolo de natação não foi capaz de produzir analgesia em ratos com dor neuropática. Acreditamos que esse resultado se deva ao fato de que o modelo de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo ciático resultar em alterações complexas periféricas e centrais. Essas alterações foram vistas, em parte, neste experimento onde houve uma perda de fibras aferentes primárias nociceptivas nos terminais medulares dos animais lesionados, observado através da diminuição da imunorreatividade ao CGRP nos animais lesionados.

Constrição crônica do nervo ciático é capaz de aumentar o padrão de imunorreatividade da serotonina localizada na medula espinal de ratos. Entretanto, este mecanismo não foi suficiente para modular a dor de origem neuropática, não diminuindo a alodinia mecânica presente nestes animais.

Estudos posteriores são necessários para a elucidação dos mecanismos centrais, a partir de uma verificação mais apurada dos interneurônios medulares responsáveis pela liberação dos opióides endógenos. Uma análise da liberação desses neuropeptídeos associada a uma observação da

distribuição de receptores opióides localizados nos neurônios medulares envolvido na transmissão da informação nociceptiva pode auxiliar na compreensão dos resultados obtidos nesse estudo. Além disso, é importante estudar a imunorreatividade da serotonina na região do tronco encefálico em especial na substância cinzenta periaquedutal, onde se encontram núcleos serotoninérgicos importantes na modulação da informação nociceptiva.

Além disso, faz-se necessário estudar os mecanismos pelos quais o sistema opióide possa estar agindo sobre o modelo de dor muscular. Uma vez que este pode ter origem pelo circuito medular, via liberação de serotonina sobre interneurônios opióides, ou através de liberação sistêmica deste.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, 1000: 40-56, 2004.

BARDIN, L.; JOURDAN, D.; ALLOUI, A.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Differential influence of two serotonin 5-HT₃ receptor antagonists on spinal serotonin-induced analgesia in rats. *Brain Res.*, 15;765:267-72, 1997.

BARDIN, L.; TARAYRE, J.P.; Malfetes, N.; KOEK, W.; COLPAERT, F.C. Profound, non-opioid analgesia produced by the high-efficacy 5-HT(1A) agonist F 13640 in the formalin model of tonic nociceptive pain. *Pharmacol.*, 67(4):182-94, 2003.

BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain – a clinical perspective. *Nature Clin. Prat. Neurol.*, 2: 95-106, 2006.

BARON, R.; SAGUER, M. Potherpetiv neuralgia. Are C-nociceptors involved in signaling and maintenance of tactile allodynia? *Brain*, 116: 1477-96, 1993.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann. Neurol.*, 4(5):451-62, 1978.

BASBAUM, A. L.; MARLEY, N.J.; O'KEEFE, J. Reversal of morphine and stimulus-produced analgesia by subtotal spinal cord lesions. *Pain*, 3: 43-56, 1977.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências Desvendando O Sistema Nervoso**, Porto Alegre:Artmed, 855p., 2003.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.*, 7:309-38, 1984.

BASBAUM, A.L.; WOOLF, C.J. Pain. *Current Biology*, 9: 429-431, 1999.

BEMENT, M.K.; SLUKA, K.A. Low-intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 86: 1736-40, 2005.

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33: 87-107, 1988.

BENNETT, G.J. Does a neuroimmune interaction contribute to the genesis of painful peripheral neuropathies? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 7737-38, 1999.

BONICA, J.J.; YAKSH, T.; LIEBESKIND, J.C. Biochemistry and modulation of nociception end pain in Bonica J.J. – **The management of pain**, 3rd Ed, vol.1, Malvern, Lea end Febiger, 95-121, 2001.

BOUIX, O.; NAJIMI, A.; LEONIR, V.; KERDELHUE, B.; ORSETTI, A. Endogenous opioid peptides stimulate post-exercise insulin response to glucose in rats. *Int. J. Sports Med.*, 17: 80-4, 1996.

CARMODY, J.; COOPER, K. Swim stress reduces chronic pain in mice through an opioid mechanisms. *Neurosci. Lett.*, 74:358-63, 1987.

CASEY, K. Forebrain mechanisms of nociception and pain: Analysis through imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 7668–7674, 1999.

COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain. Res. Rev.*, 24: 28-66, 1993.

DELEO, J.A.; YEZIERSKI, R.P. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*, 90: 1-6, 2001.

DeLEO, J.A.; COOMBS, D.W.; WILLENDRING, S.; COLBURN, R.W.; FROMM, C.; WAGNER, R.; TWITCHELL, B.B. Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain*, 56: 9-16, 1994.

DESEURE, K.; KOEK, W.; COLPAERT, F.C.; ADRIAENSEN, H. The 5-HT(1A) receptor agonist F 13640 attenuates mechanical allodynia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 5;456(1-3):51-7, 2002.

DEVOR, M.; RABER, O. Heritability of symptoms in an experimental model of neuropathic pain. *Pain*, 42: 51-67, 1990.

DEVOR, M.; SCHONFELD, D.; SELTZER, Z.; WALL, P.D. Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J. Comp. Neurol.*, 185: 211-220, 1979.

DEY, S.; SINGH, R. H.; DEY, P. K. Exercise training: significance of regional alterations in serotonin metabolism of rat brain in relation to antidepressant effect of exercise. *Physiol. Behav.*, 52: 1095-1099, 1992

DOBOLYI, A.; IRWIN, S.; MAKARA, G.; USDIN, T.B.; PALKOVITS, M. Calcitonin gene-related peptide-containing pathways in the rat forebrain. *J. Comp. Neurol.*, 489: 92-119, 2005.

DROSTE, C.; GREENLEE, M.W.; SCHRECK, M.; ROSKAMM, H. Experimental pain thresholds and plasma beta-endorphin levels during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23: 334-342, 1991.

FIELDS, H.L. **Pain**. New York: McGraw-HillBook Company, 353p, 1987.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.L. Brain stem control of spinal pain-transmission neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, 40: 217-48, 1978.

GAMBLE, M.; BANCROFT, J.D. **Theory and practices of histological techniques**. 6ed. Elsevier, 2008

GOLDFARB, A. H.; JAMURTAS, A. β -endorphin response to exercise: an update. *Sports Med.*, 24: 8-16, 1997.

GOBATTO, C.A., DE MELLO M.A., SIBUYA, C.Y., AZEVEDO, J.R., SANTOS, L.A. KOKOBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Bioch. Physiol.*, 130: 21-27, 2001.

GYLBES, J.M.; SWEET, W.H. **Neurologic tratament of persistent pain: physiological and pathological Mechanisms of human pain**. Karger, Basel, 1989.

HOFFMAN, M.D.; SHEPANSKI, M.A.; RUBLE, S.B.; VALIC, Z.; BUCKWALTER, J.B.; CLIFFORD, P.S. Intensity and Duration Threshold for aerobic exercise-induced analgesia to pressure pain. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 85:1183-1187, 2004.

JANAL, M.N.; COLT, E.W.; CRAWFORD, C.W; GLUSMAN, M. Pain sensitivity, mood and plasma beta-endorphin levels in man following long-distance running: effects of naloxona. *Pain*, 19: 13-25, 1984.

HERBISON, G.J.; JAWEED, M.M.; DITUNNO, J.F. Effect of swimming on reinnervation of rat skeletal muscle. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, 37(11):1247-51. 1974.

JENSEN, T.S.; BARON, R. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. *Pain*, 102(1-2):1-8, 2003.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210, 2001.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Princípios da Neurociência**. São Paulo: Manole, 1412 pg, 2003.

KAJANDER, K.C.; BENNETT, G.J. Onset of a painful peripheral neuropathy in rat: A partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in A β and A δ primary afferent neurons. *J. Neurophysiol.*, 734-744, 1992.

KANAREK, R.B.; GERSTEIN, A.V.; WILDMAN, R.P.; MATHES, W.F.; D'ANCI, K.E. Chronic running-wheel activity decreases sensitivity to morphine-induced analgesia in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 61: 19-27, 1998.

KIM, S.H.; CHUNG, J.M. An experimental model of peripheral neuropathy produced by segmental spine nerve ligation in the rat. *Pain*, 50: 355-363, 1992.

KIM, Y.I. Mechanical allodynia is more strongly manifested in older rats in an experimental model of peripheral neuropathy. *Neurosci. Lett.*, 199: 158-160, 1995.

KOLESNIKOV, Y.; ABDERRAHMAN, A.E.M.; RUTINHAUSER, U.; PASTERNAK, G. Reorganization of dorsal root ganglion neurons following chronic sciatic nerve constriction injury: correlation with morphine and lidocaine analgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, 568: 124-133, 2007.

KUPHAL, K.E.; FIBUCH, E.E.; TAYLOR, B.K. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. *Pain*, 1-9, 2007.

LeBARS, D. Serotonin and pain, In Osborne N, hamon. M, (Eds), *Neuronal Serotonin*, Wiley, New York, 171-226, 1988.

LEE, D.H.; CHUNG, J.M. Neuropathic pain in neonatal rats. *Neurosci. Lett.*, 209: 140-142, 1996.

LEKAN, H.A. Sprouting of A β fibers into lamina II of the rat dorsal horn in peripheral neuropathy. *Neurosci. Lett.*, 208: 147-150, 1996.

CAMPION, M.R. **Hidroterapia: princípios e prática**. Manole: São Paulo, 332 pg, 2000.

MACFARLANE, B. V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H. A. E. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. *Pharmacol. Therap.*, 75: 1-19, 1997.

MANNION, R.J.; DOUBELL, T.P., CGGESHALL, R. E.; WOOLF, C.J. Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. *J. Neurosci.*, 16: 5189-95, 1996.

MAPP, P.I.; TERENGI, G.; WALSH, D.A.; CHEN, S.T.; CRUWYS, S.C.; GARRETT, N.; BLAKE, D.R. Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. *Neurosci.*, 57: 1091-1096, 1993.

MAVES, T.J. Possible chemical contribution from chronic-gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 54: 57-69, 1993.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150: 971-8, 1965.

MILLAN, M.J. The induction of pain: An integrative review. *Prog. Neurobiol.*, 57: 1-164, 1999.

MOGIL, J. S.; STERNBERG, W. F.; BALIAN, H.; LIEBESKIND, J. C.; SADOWSKI, B. Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: A parametric analysis in mice. *Physiol. Behav.*, 59: 123-132, 1996.

OCHOA, J.; TOREBJORK, H.E.; CULP, W.J.; SCHADY, W. Abnormal spontaneous activity in single sensory nerve fibres in humans. *Muscle Nerve*, 5: 74-77, 1982.

PALECEK, J.; PALECKOVA, V.; MILLIS, W.V. The roles of pathways in the spinal cord lateral and dorsal funiculi in signaling nociceptive somatic and visceral stimuli in rats. *Pain*, 96: 297-307, 2002.

PAZO, J.H. Fisiologia da dor. Em **Fisiologia humana de Hussay**, cap 63. Artmed: Porto Alegre 7 ed, 1124 pg, 2004.

PARENT, A. **Human Neuroanatomy**, 9ed, Quebec, Canadá, pg 325-405, 1996.

PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**, 3 ed., Australia, pg. 121 – 154, 2004

PESCHANSKI, M.; KAYSER, V.; BESSON, J.M. Behavior evidence for a crossed ascending pathway for pain transmission in the anterolateral quadrant of the rat spinal cord. *Brain Res.*, 376:164-168, 1986.

Portenoy RK, Farrar JT, Backonja MM, Cleeland CS, Yang K, Friedman M, Colucci SV, Richards P. Long-term use of controlled-release oxycodone for noncancer pain: results of a 3-year registry study. *Clin. J. Pain*, 23(4):287-99, 2007.

PRADO, W.A., FAGANELLO, F.A. The anterior pretectal nucleus participates as a relay station in the glutamate-, but not morphine-induced antinociception from the dorsal raphe nucleus in rats. *Pain*, 88: 169-176, 2000.

PURVES, D.; AUGUSTINI, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIS, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M., **Neurociências**. Porto Alegre:Artmed, 728 pg, 2005.

RALSTON, H.J.; RALSTON, D.D. The distribution of dorsal root axons in laminae I, II and III of the macaque spinal cord: a quantitative electron microscope study. *J. Comp. Neurol.*, 15: 643-84, 1979.

RASIA-FILHO, A.A.; XAVIER, L.L.; DOS SANTOS, P.; GEHLEN, G.; ACHAVAL, M. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. *Brain Res. Bull.*, 58: 67-75, 2002.

SHORTLAND, P., WOOLF, C. J. & FITZGERALD, M. Morphology and somatotopic organization of the central terminals of hindlimb hair follicle afferents in the rat lumbar spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 289: 416-433, 1989.

SHORTLAND, P.; WOOLF, C.J. Chronic peripheral nerve section results in a rearrangement of the central axonal arborizations of axotomized A beta primary afferent neurons in the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 330: 65-82, 1993.

SPARLING, P.B.; GIUFFRIDA, A.; PIOMELLI, D.; ROSSKOPF, L.; DIETRICH, A. Exercise activates the endocannabinoid system. *Neurol.*, 14: 2209-11, 2003.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, 43: 205-218, 1990.

SHIMOYAMA, M.; TANAKA, K.; HASUE, F.; SHIMOYAMA, N. A mouse model of neuropathic cancer pain. *Pain*, 99: 167-174, 2002.

SHYU, B.C.; ANDERSSON, S.A.; THOREN, P. Endorphin mediated increase in pain threshold induced by long-lasting exercise in rats. *Life Sci.*, 30: 833-840, 1982.

SINGH, M.E.; VERTY, A.N.; MCGREGOR, I.S.; MALLET, P.E. A cannabinoid receptor antagonist attenuates conditioned place preference but not behavioral sensitization to morphine. *Brain Res.*, 1026: 244-53, 2004.

SUGIURA, Y.; LEE, C.L.; PERL, E.R. Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin. *Science*, 7: 358-61, 1986.

SLUKA, K.A.; KALRA, A.; MOORE, S.A. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Musc. Nerve*. 24(1): 37-46, 2001.

SWAROWSKY, A.; MONTEIRO, A.F.; XAVIER, L.L.; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: A semi-quantitative analysis. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 41: 230-8, 2005.

XAVIER, L.L.; VIOLA, G.G.; FERRAZ, A.C.; DA CUNHA, C.; DEONIZIO, J.M.; NETTO, C.A.; ACHAVAL, M. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area, *Brain Res. Brain. Res. Protoc.*, 16: 58-64, 2005.

XU, X.J. Possible impact of genetic differences on the development of neuropathic pain-like behaviors after unilateral sciatic nerve ischemic injury in rats. *Pain*, 89: 135-145, 2001.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 429: 23-37, 2001.

WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Philadelphia: Elsevier, 1239p, 2006.

WALL, P.D.; DEVOR, M.; INBAL, R.; SCADDING, J.W.; SCHONFELD, D.; SELTZER, Z.; TOMKIEWICZ, M.M. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia. *Pain*, 7: 103-110, 1979.

WANG, L.X.; WANG Z. J. Animal and cellular of chronic pain. *Adv. Drug. Delivery Rev.*, 55:949-965, 2003.

WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J. Clin. Neurophysiol.*, 14: 2-31, 1997.

WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N.; CARLTON, S.M. In PAXINOS cap 7. **The Rat Nervous System**, 3 ed., Australia, 121-154, 2004.

WOOLF, C.J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306: 686-88, 1983.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 9;288:1765-9, 2000.

WOOLF, C.J.; SHORTLAND, P.; COGGESHALL, R.E. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, 2;75-8, 1992.

WOOLF, C.J.; DOUBELL, T.P., The patophysiology of chronic pain-increased sensitivity to low threshold A beta fibre inputs. *Curr. Pain Neurobiol.*, 4:525-34, 1994.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: a etiology, symptoms, mechanisms, and management. *Pain*, 353: 1959-1964, 1999.

YU, L.C.; HANSSON, P.; LUNDEBERG, T. The calcitonin gene-related peptide antagonist CGRPs-37 increases the latency to withdrawal responses bilaterally in rats with unilateral experimental mononeuropathy, an effect reversed by naloxone. *Neurosci.*, 7: 523-531, 1996.