



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MARIA EUGENIA ORTIZ

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR PARA ADENOSINA A₁ PERIFÉRICO E
ESPINAL NA ANALGESIA INDUZIDA PELA MANIPULAÇÃO DA FASCIA
PLANTAR NA INFLAMAÇÃO: UM ESTUDO NÃO CLÍNICO**

Palhoça
2022

MARIA EUGENIA ORTIZ

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR PARA ADENOSINA A₁ PERIFÉRICO E
ESPINAL NA ANALGESIA INDUZIDA PELA MANIPULAÇÃO DA FASCIA
PLANTAR NA INFLAMAÇÃO: UM ESTUDO NÃO CLÍNICO**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Daniel F. Martins, Dr.

Palhoça

2022



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Avaliação do papel do receptor para adenosina A₁ periférico e espinal na analgesia induzida pela manipulação da fascia plantar na inflamação: um estudo não clínico

MARIA EUGENIA ORTIZ
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 25 de julho de 2022.

Doutor Daniel Fernandes Martins (Orientador) *Daniel F. Martins.*

Doutor Afonso Shiguemi Inoue Salgado (Avaliador externo – Natural Quanta) - *presente por videoconferência*

Doutora Anna Paula Piovezan (Avaliador interno) - *presente por videoconferência*

Gislaine Tezza Rezin

Professora Doutora Gislaine Tezza Rezin
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNISUL

- **Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina, Sede, Reitoria** - Av. José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
- **Unisul Região Sul**
 - **Campus Tubarão** - Avenida José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon, Caixa Postal 370 - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
 - **Campus Araranguá** - Rodovia Governador Jorge Lacerda, 3201, Bairro Urussanguinha - 88905-355, Araranguá, SC - Fone **0800 970 7000** - 48 3521-3000
 - **Campus Braço do Norte** - Rodovia SC 370, 1023, Rio Bonito - 88750-000, Braço do Norte, SC - Fone **0800 970 7000** - 48 3621-3925
 - **Campus Içara** - Rua Linha Três Ribeirões, Loteamento Centenário, 250, Bairro Liri - 88820-000, Içara, SC - Fone **0800 970 7000** - 48 3621-3460
- **Unisul Região Grande Florianópolis**
 - **Campus Pedra Branca** - Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, 88137-270, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1000
 - **Campus Florianópolis** - Rua Dib Mussi, 366, Centro - 88015-110, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
 - Rua Trajano, 219, Centro - 88010-010, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
- **Campus Unisul Digital** - Av. Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - 88137-900, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1200

O89 Ortiz, Maria Eugenia, 1959 -
Avaliação do papel do receptor para adenosina A1 periférico e
espinal na analgesia induzida pela manipulação da fascía plantar na
inflamação : um estudo não clínico / Maria Eugenia Ortiz. – 2022.
58 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina,
Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins

1. Dor - Tratamento. 2. Dor musculoesquelética. 3. Adenosina. 4.
Fáscia (Anatomia). I. Martins, Daniel Fernandes. II. Universidade do
Sul de Santa Catarina. IV. Título.

CDD (21. ed.) 616.0472

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Julieta e José por terem me ensinado a ter coragem, humildade, determinação e paciência.

A minha companheira Teresa Cristina por me segurar pela mão na alegria e na tristeza.

As minhas irmãs Roselene, Cristina e Joseli pelos constantes incentivos.

Ao meu anjo da guarda Maria Aparecida por me cuidar e me proteger.

Ao meu querido orientador Dr. Daniel Fernandes Martins por acreditar em mim, me ensinar e me colocar no mundo da pesquisa. Onde não havia caminho ele construiu atalhos seguros.

A minha madrinha Larissa Senhorim por ter me conduzido até aqui de forma tão amorosa. Sua amizade, seu empenho, seu amor a fisioterapia e aos pacientes são hoje minha referência nessa nova fase de vida.

A minha amiga Lúcia, amiga irmã que me apoia desde a graduação.

Aos professores do PPGCS pelo acolhimento e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório em especial, Bruninha, Gabriel e Rafaela por toda ajuda e carinho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

Introdução: Fisioterapeutas usam técnicas de terapia manual para tratar disfunção musculoesquelética e dor, mas o envolvimento dos receptores adenosinérgicos no efeito analgésico dessa técnica não tem sido investigado.

Objetivo: Avaliar o envolvimento do receptor adenosinérgico A₁ no efeito anti-hiperalgésico da técnica de reorganização miofascial (RMF), aplicada na pata de camundongos com inflamação persistente periférica.

Métodos: Estudo experimental (CEUA - Registro nº 21.021.4.01.IV). Camundongos foram submetidos ao modelo animal de indução de inflamação periférica, por meio de injeção i.pl. com o Adjuvante Completo de Freund (CFA) a 50%. Utilizou-se à técnica manual por 3, 9 ou 15 minutos. Frequência de retirada aos estímulos mecânicos foi avaliada antes e após o CFA (24h e 96h após). Os receptores adenosinérgicos foram avaliados pela administração sistêmica (intraperitoneal), central (intratecal) e periférica (intraplantar) de cafeína em 24h e 96h após a injeção de CFA. Também foi realizada a mensuração do edema da pata dos animais. A participação do receptor A₁ foi investigada utilizando o 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX), um antagonista seletivo para esse receptor em 24h e 96h após CFA. Valores de *p* menores que 0,05. foram considerados significativos.

Resultados: O tratamento com RMF reduziu a hiperalgesia mecânica, mas não o edema. A redução da hiperalgesia pela RMF foi prevenida pelo pré-tratamento dos animais com cafeína e DPCPX por todas as vias administradas. O melhor tempo que resulta em melhor resultado analgésico é 9 minutos.

Conclusão: Em conjunto, foi demonstrado o envolvimento do receptor A₁ no efeito anti-hiperalgésico da RMF em um modelo animal de dor. Assim, fornece-se uma possível base de mecanismo de ação para o alívio da dor induzida por uma técnica de terapia manual.

Descritores: Dor musculoesquelética. Adenosina. Terapia Manual. Fascia. Terapias em estudo.

ABSTRACT

Introduction: *Physiotherapists use manual therapy techniques to treat musculoskeletal dysfunction and pain, but the involvement of adenosinergic receptors in the analgesic effect of this technique has not been investigated.*

Objective: *To evaluate the involvement of the adenosinergic A1 receptor in the anti-hyperalgesic effect of the myofascial reorganization technique (RMF), applied to the paw of mice with persistent peripheral inflammation.*

Methods: *Experimental study (CEUA - Registration No. 21.021.4.01.IV). Mice were submitted to the animal model of induction of peripheral inflammation, by means of i.pl. with 50% Complete Freund's Adjuvant (CFA). Manual technique was used for 3, 9 or 15 minutes. Frequency of withdrawal from mechanical stimuli was evaluated before and after CFA (24h and 96h after). Adenosinergic receptors were evaluated by systemic (intraperitoneal), central (intrathecal) and peripheral (intraplantar) administration of caffeine at 24h and 96h after CFA injection. The measurement of paw edema of the animals was also performed. The participation of the A1 receptor was investigated using 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX), a selective antagonist for this receptor at 24h and 96h after CFA. p values less than 0.05. were considered significant.*

Results: *Treatment with RMF reduced mechanical hyperalgesia but not edema. Reduction of hyperalgesia by RMF was prevented by pre-treatment of animals with caffeine and DPCPX by all administered routes.*

Conclusion: *Together, the involvement of the A1 receptor in the antihyperalgesic effect of RMF in an animal model of pain was demonstrated. Thus, a possible mechanism of action basis for pain relief induced by a manual therapy technique is provided.*

Keywords: Musculoskeletal pain. Adenosine. Manual therapy. fascia. Therapies under study.

LISTA DE ABREVIATURAS

TGF β - Fator de crescimento transformador beta (do inglês, *Transforming Growth Factor-beta*)

MEC - Matriz extracelular

MFB – Miofibroblasto

MFP – Manipulação fascial plantar

RMF - Reorganização miofascial

FRS – Sociedade de Pesquisa da Fascia (do inglês, *Fascia Research Society*)

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association Study of Pain*)

SNP - Sistema nervoso periférico

SNC - Sistema nervoso central

TM – Terapia Manual

MAT – Mobilização articular do tornozelo

ATL - Aponeurose toracolombar

ATP - Adenosina trifosfato (do inglês, *Adenosine Triphosphate*)

CFA - Adjuvante Completo de Freund (do inglês, *Complete Freund's Adjuvant*)

i.pl. – intraplantar

i.p. - intraperitoneal

i.t. - intratecal

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumoral Necrose Factor*)

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

LaNEx – Laboratório de Neurociência Experimental

RAs – Receptores para adenosina

GPCRs – Receptores acoplados a proteína G (do inglês, *G Protein-Coupled Receptors*)

PAG – Substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *Periaqueductal Grey Matter*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia anatômica e topografia da fascia.....	18
Figura 2 - Imagem in vivo da fascia.....	19
Figura 3 - Presença de inervação na fascia	20
Figura 4 - Sequência do protocolo de estudo.	26
Figura 5 - Ilustração da injeção i.pl. de CFA (50%) na pata posterior direita de camundongo.....	29
Figura 6 - Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	32
Figura 7 - Avaliação do edema da pata do camundongo por meio do micrômetro digital	33
Figura 8 - Protocolo de terapia manual RMF	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Canais iônicos mecano-sensíveis em eucariontes.....	16
Quadro 2 – Grupos de animais 1- avaliação do efeito da aplicação da técnica de RMF na pata por diferentes tempo sobre a hiperalgesia mecânica	28
Quadro 3 – Grupos de animais 2 - Análise da administração de cafeína.....	29
Quadro 4 – Grupos de Animais 3 – avaliação do envolvimento do RA ₁ periférico e espinal sobre o efeito anti-hiperalgésico da RMF na pata.....	29
Quadro 5 – Variáveis do estudo.....	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
1.1.1 Aspectos conceituais e epidemiológicos da dor	8
1.1.2 Mecanismos endógenos de controle da dor	10
1.1.3 O papel da adenosina e do receptor A ₁ na dor	12
1.1.4 Mecanobiologia	15
1.1.5 O sistema fascial.....	17
1.1.6 Técnica de reorganização miofascial.....	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. MÉTODOS	25
3.1 TIPO DE ESTUDO	25
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	25
3.3 ANIMAIS	25
3.4 CÁLCULO DA AMOSTRA	25
3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO	27
3.5.1 Experimento 1: avaliação do efeito da aplicação da técnica de RMF na pata por diferentes tempos sobre a hiperalgesia mecânica e edema.	28
3.5.2 Experimento 2: avaliação do envolvimento dos RA _s periféricos e espinais sobre o efeito anti-hiperalgésico da RMF na pata.	28
3.5.3 Experimento 3: avaliação do envolvimento do RA ₁ periférico e espinal sobre o efeito anti-hiperalgésico da RMF na pata.	29
3.6 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS	29
3.6.1 Modelo inflamatório animal de hiperalgesia	29
3.6.2 Mensurações de hiperalgesia	29
3.6.3 Mensuração do edema	32
3.6.4 Tratamento com RMF	33
3.6.5 Investigação do envolvimento dos RA _s no efeito anti-hiperalgésico da reorganização miofascial	34
3.6.5.1 Avaliação do efeito da administração de cafeína em diferentes sítios modulatórios na analgesia causada pela RMF.....	34

3.6.5.2 Avaliação do papel do RA₁ em sítios periférico e espinal na analgesia causada pela RMF	35
3.7 VARIÁVEIS DO ESTUDO	35
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	36
3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	36
4. ARTIGO.....	36
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
ANEXO A – Parecer de Aprovação da CEUA.....	49

1. INTRODUÇÃO

A dor é um tema de interesse global devido a sua prevalência e efeitos sobre a qualidade de vida do ser humano além dos custos elevados para os cofres públicos. No Brasil foi realizado um estudo transversal, em questionário pela internet em uma amostra nacionalmente representativa de adultos do Brasil, para estimar a prevalência e características da dor crônica na população brasileira. Dos 27.345 indivíduos, 20.830 (76,17%) apresentaram dor crônica, recorrente ou duradoura com duração de pelo menos 6 meses¹. Ainda no Brasil, no ano de 2019, foi realizado um estudo observacional transversal utilizando dados coletados no início do ELSA-Brasil (estudo multicêntrico prospectivo desenvolvido por centros de investigação localizados em seis estados brasileiros). A coorte ELSA-Brasil é constituída por servidores públicos ativos ou aposentados, com idade entre 35 e 74 anos, de sete instituições públicas de ensino superior e pesquisa. Foram 15.195 servidores públicos (54,4% do sexo feminino). A prevalência de qualquer dor foi de 62,4% (intervalo de confiança de 95% 61,6% – 63,2%)². A dor é uma experiência individual e complexa, influenciada por fatores biopsicossociais³. É iniciada por informações sensoriais transmitidas a partir de um estímulo desagradável, porém muito modificada por perspectivas afetivas (ou seja, emocionais), culturais e cognitivas. Embora os processos físicos que retransmitem um estímulo para se tornar a “sensação de dor” possam ser descritos, a natureza da dor como sensação e seu significado geral para o indivíduo são únicos⁴.

No processamento da dor os componentes principais, incluem a entrada aferente sensorial para a medula espinhal, transmissão para regiões espinhais, integração supraespinhal e regulação descendente; a modulação da dor pode ocorrer dentro de cada um ou mais desses domínios⁵. A dor nociceptiva de origem inflamatória representa uma das principais categorias de dor e envolve aumento da sinalização aferente (sensibilização periférica), aumento da transmissão da dor (sensibilização espinhal) e interpretação central da dor (integração e modulação)⁶. Atualmente sabe-se que o controle endógeno descendente da dor tem início no tronco encefálico e pode ativar diferentes sistemas (opioidérgico, adenosinérgico, endocanabinoidérgico, noradrenérgico, serotoninérgico etc.). Esses sistemas atuam de diferentes formas no controle da dor, pois são dependentes por sua vez, do tipo de receptor envolvido, do sítio de ação no corno posterior da medula espinhal (CPME) e das sinalizações neuroquímicas que regulam o balanço entre facilitação e inibição⁷.

Estudos pré-clínicos vêm identificando os receptores adenosinérgicos como potenciais alvos no manejo da dor aguda e crônica como aponta a revisão de Vincenzi e colaboradores (2020)⁸. A adenosina é uma substância onipresente, liberada por várias células, como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, plaquetas e células musculares, incluindo neurônios e neuroglia. A principal fonte de adenosina em estados patológicos é o ATP. A adenosina e o trifosfato de adenosina (ATP) exercem múltiplas influências na transmissão da dor em locais periféricos e espinhais. Existem quatro subtipos conhecidos de receptores para adenosina (RA_s) - referidos como RA₁, RA_{2A}, RA_{2B} e RA₃ - cada um dos quais tem um perfil farmacológico único. Os receptores para adenosina A₁ e seus agonistas são os mais estudados em modelos pré-clínicos, incluindo modelos inflamatórios e neuropáticos que exibem estados de hiper-responsividade, tais como: alodinia e hiperalgesia⁹. Em 2010 um estudo em camundongos com acupuntura descobriu que a adenosina foi liberada durante a aplicação¹⁰. Os achados indicaram que a adenosina é central para as ações mecanicistas da acupuntura. A inserção e rotação manual das agulhas de acupuntura desencadeou um aumento geral na concentração extracelular de purinas, incluindo o neurotransmissor adenosina. Os efeitos estão associados a um efluxo de ATP citosólico suficiente para elevar a adenosina extracelular que pode se acumular durante esse tratamento e atenuar a dor em parte pela ativação de receptores A₁, em aferentes sensoriais das trilhas nervosas ascendentes¹⁰. Logo após nosso grupo de pesquisa em 2013 verificou que a mobilização articular diminuiu a hiperalgesia mecânica em camundongos e esse efeito foi revertido pela aplicação prévia da cafeína via periférica e central¹¹.

Os RA_s são os principais alvos da cafeína e curiosamente a cafeína é a substância farmacológica mais ingerida no mundo¹². Devido ao seu amplo consumo em diferentes níveis pela maioria dos segmentos da população mundial, o público e a comunidade científica manifestam interesse no uso da cafeína e seus possíveis efeitos adversos sobre saúde humana¹³. A cafeína, em doses menores do que as implicadas na analgesia adjuvante, bloqueia a anti-hiperalgesia de diversos agentes podendo interferir nas ações analgésicas desses agentes e na eficácia das modalidades terapêuticas como a acupuntura, estimulação elétrica nervosa transcutânea, exercícios e mobilização articular¹²⁻¹⁴.

Esse estudo de maneira inédita testa o envolvimento do receptor para adenosina A₁ em uma técnica de terapia manual. A TM é considerada uma das mais

antigas intervenções na medicina e pode ser descrita como uma prática de movimentos passivos e aplicação de forças mecânicas em articulações e tecidos moles¹⁵. Compreender os efeitos das forças mecânicas no corpo através de técnicas manipulativas é fundamental para a fisioterapia na modalidade terapia manual. O tema desse projeto busca avançar o conhecimento acerca do entendimento dos mecanismos e neurocircuitos envolvidos nos efeitos das manipulações. Para isso, se fez necessário juntar esforços unindo a experiência dos profissionais clínicos a pesquisa pré-clínica, a fim de elucidar essa lacuna do conhecimento. A interação entre células, tecidos neurais e não-neurais é um fenômeno fisiológico ainda pouco conhecido e a sua compreensão poderia explicar melhor os efeitos das técnicas de TM e otimizar (mais efeito com menos estímulos) a sua aplicação.

A técnica de manipulação elegida para este estudo, a Reorganização Miofascial (RMF) encontra-se dentro da especialidade TM na fisioterapia e foi descrita por França e colaboradores¹⁵⁻¹⁹. O uso dessa técnica implica na habilidade palpatória em reconhecer áreas e trajetos de resistências e tensões, e no ajuste manual preciso de cargas mecânicas tangenciais impostas ao tecido e mantidas por um período de tempo, como descrito anteriormente em alguns modelos matemáticos da bioengenharia aplicados em tecidos humanos¹⁶. Recentes estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram resultados promissores na efetividade da RMF na redução da dor, fato que justifica o presente estudo^{17,18}. No campo da TM existe claramente a necessidade de além de entendermos se as mesmas funcionam, entendermos porque funcionam. Pesquisas sobre mecanismos de ação, aperfeiçoam os recursos terapêuticos utilizados na fisioterapia, maximizando os efeitos dos protocolos de tratamentos¹⁹.

A principal hipótese do presente estudo é suportada pelo estudo de Goldman e colaboradores, em que os autores especulam que outros tratamentos não farmacológicos da dor crônica, como as manipulações e massagens quiropráticas, modalidades que envolvem a manipulação mecânica de articulações e músculos, também podem estar associados a um efluxo de ATP citosólico suficiente para elevar a adenosina extracelular. Como na acupuntura, a adenosina pode se acumular durante esses tratamentos e atenuar a dor em parte pela ativação de receptores A₁ em aferentes sensoriais das vias ascendentes¹⁰.

Assim, o presente estudo tem como perguntas de pesquisa:

- Qual o melhor tempo para a melhor resposta anti-hiperálgésica produzida pela técnica de RMF na inflamação persistente?
- O receptor para adenosina A₁ está envolvido no efeito anti-hiperálgésico da técnica RMF?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Aspectos conceituais e epidemiológicos da dor

Definir a dor tem sido um desafio constante e complexo. Nos últimos 40 anos o conceito de dor vem sendo revisado por forças tarefa da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), levando em consideração os aspectos subjetivos da dor, demonstrando interesse e empatia em especial pelos pacientes que não conseguem definir ou descrever adequadamente seu sintoma doloroso. Na última revisão em junho de 2020 pequena alteração foi feita, mas pode impactar de maneira importante as instituições que controlam os serviços de saúde. Após a revisão o conceito segundo a IASP ficou da seguinte forma, “A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial”²⁰.

A compreensão abrangente da dor levou a um modelo mais completo que considera em si os fatores biológicos, psíquicos e sociais. O modelo bio-psico-social classifica os tipos de dor, sendo elas: 1) dor nociceptiva, sendo aguda e ocasionada por um trauma ou pelo registro de estímulos que podem ferir e ameaçar a integridade corporal; 2) dor nociplástica - resultante de uma falha no sistema nervoso central (SNC), com um aumento da excitabilidade central ou diminuição da inibição central, causando dor crônica incompatível com o fator que desencadeou a dor; 3) dor neuropática – devido a uma lesão ou doença que acometa os neurônios sensoriais, ou devido a doenças metabólicas; 4) psicológica – relacionada a fatores psicológicos relevantes para a dor e; 5) disfunção do sistema de movimento²¹.

No diagnóstico médico, a dor é considerada como um sintoma de uma condição subjacente que motiva o indivíduo a se retirar de situações prejudiciais, a proteger uma parte do corpo danificada enquanto cura e a evitar experiências semelhantes no

futuro. A maioria dos casos de dor se resolve uma vez que o estímulo nocivo é removido e o corpo curado, mas pode persistir apesar da remoção do estímulo e cicatrização aparente do corpo, gerando sofrimento e angústia. É a razão mais comum para consultas médicas na maioria dos países desenvolvidos, sendo um sintoma importante que pode interferir na qualidade de vida das pessoas²².

A dor e a inflamação estão funcionalmente ligadas em vários níveis: formação de exsudato, inchaço do tecido e mediadores inflamatórios são responsáveis pela “dor inflamatória”²³. Durante os estágios iniciais de uma resposta inflamatória local à um dano tecidual, uma interação complexa entre os diversos elementos do tecido celular, humoral e conjuntivo ocorre. Os estímulos térmicos, químicos ou mecânicos são fortes o suficiente para serem capazes de causar danos aos tecidos, ativar neurônios sensoriais especializados, comumente chamados de nociceptores, e transmitir o sinal nocivo ao sistema nervoso central⁴. Se as condições anormais forem transitórias, uma resposta inflamatória aguda bem-sucedida retorna o sistema aos pontos de ajuste homeostáticos basais. Se, ao contrário, as condições anormais forem mantidas, então um estado inflamatório contínuo muda o sistema para diferentes pontos de ajuste, como ocorre durante a inflamação crônica²⁴. A resposta inflamatória aguda é normalmente encerrada assim que o insulto desencadeador é eliminado, a infecção é eliminada e o tecido danificado é reparado. O término da resposta inflamatória e a transição para o estado homeostático é um processo ativo e altamente regulado conhecido como resolução da inflamação²⁵.

O primeiro a definir os sintomas clínicos da inflamação foi o médico romano Cornelius Celsus no século I DC. Esses sintomas passaram a ser conhecidos como os quatro sinais cardeais da inflamação: vermelhidão e inchaço com calor e dor (*rubor et tumor cum calore et dolore*)²⁶. A base fisiológica dos quatro sinais cardinais de inflamação foi revelada muito mais tarde por Augustus Waller (1846) e Julius Cohnheim (1867), que descobriram a migração de leucócitos dos vasos sanguíneos e outras alterações vasculares características de uma resposta inflamatória aguda²⁷. Um quinto sinal cardinal, perturbação da função, foi adicionado por Rudolph Virchow em 1858 em seu livro *Cellular pathologie*, sendo o único sinal universal que acompanha todos os processos inflamatórios que percebe, interpreta e responde inibindo ou facilitando a dor^{26,28}.

Pouco se conhece sobre a epidemiologia desta condição no Brasil²⁹. O maior volume de informações existentes no Brasil são resultados de serviços de saúde,

evidenciando prevalências entre 40% e 60% para dores musculoesqueléticas³⁰. Os gastos com esse agravo são cada vez maiores e suas consequências físicas, psicológicas e sociais são evidentes. Por causar absenteísmo, incapacidade temporária ou permanente, morbidade e elevados custos ao sistema de saúde, a dor tem sido considerada um problema de saúde pública³¹. No Brasil a carga de doenças de origem musculoesquelética alcançou o mesmo patamar dos cânceres, quando aplicado o *Disability Adjusted Life Years*³². Esses dados por si justificam o intenso esforço da comunidade científica em compreender a dor, seus mecanismos e quais abordagens possam minimizar esse quadro de sofrimento e incapacidade funcional do ser humano.

Portanto, entende-se que estudos como este, sobre uma técnica manipulativa, a RMF, podem impactar na qualidade de vida dos indivíduos, sendo relevante compreender inicialmente os mecanismos envolvidos nas intervenções pré-clínicas, para que futuramente seja possível de forma mais padronizada, estudar os efeitos dessa técnica em humanos.

1.1.2 Mecanismos endógenos de controle da dor

O corpo humano é dotado de mecanismos próprios para modular a dor, processo através do qual capta, identifica e responde a estímulos nocivos originados de tecidos periféricos denominado nocicepção. A nocicepção é o processo pelo qual intensos estímulos térmicos, mecânicos ou químicos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, denominadas nociceptores⁷. Os corpos celulares dos nociceptores estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) para o corpo e no gânglio trigeminal para a face, e possuem um ramo axonal periférico e central que inerva seu órgão-alvo e a medula espinhal, respectivamente. Os nociceptores são excitados apenas quando as intensidades de estímulo atingem a faixa nociva, sugerindo que eles possuem propriedades biofísicas e moleculares que os permitem detectar seletivamente e responder a estímulos potencialmente prejudiciais. Existem duas classes principais de nociceptores. O primeiro inclui aferentes mielinizados de diâmetro médio (A δ) que medeiam a dor aguda, bem localizada “primeira” ou rápida. Esses aferentes mielinizados diferem consideravelmente das fibras A β de maior diâmetro e de condução rápida que respondem à estimulação mecânica inócua (isto é, toque leve). A segunda classe de

nociceptores inclui fibras “C” não mielinizadas de pequeno diâmetro que transmitem dor mal localizada, “segunda” ou lenta.

Esse processo envolve cinco diferentes etapas, sendo: a transdução, condução, transmissão, percepção e modulação³³. A primeira etapa é chamada de transdução, tem início com a despolarização de terminações nervosas livres por estímulos de caráter nocivo de natureza, mecânicas, térmica ou química que alteram as características elétricas da membrana neuronal modificando o limiar de ativação ou a densidade de canais iônicos, como os canais de sódio (Na^+), canais de potássio (K^+) e canais de cálcio (Ca^{2+}), presentes na membrana e nas organelas citosólicas. A segunda etapa é condução, que consiste na propagação do impulso elétrico do sistema nervoso periférico (SNP) para o SNC. A condução tem início nas fibras dos neurônios nociceptivos primários, as quais são classificadas de acordo com o seu diâmetro, o grau de mielinização e a velocidade de condução. As fibras classificadas como do tipo A δ são pouco mielinizadas e conduzem impulsos elétricos em uma velocidade entre 12 a 30 m/s. As fibras do tipo C não possuem bainha de mielina, conduzem estímulos à uma velocidade muito mais lenta, em torno de 0,5 a 2 m/s. Essas fibras são responsáveis pela propagação do estímulo nociceptivo³³. A terceira etapa é a percepção, origina-se quando os sinais dos axônios aferentes periféricos cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios sensoriais dos nervos espinais ou trigeminais, se projetam para as regiões encefálicas. A quarta etapa é modulação e está relacionada com impulsos descendentes inibitórios ou facilitatórios que modulam a transmissão nociceptiva na medula espinal. Muitos locais de regulação da dor são localizados no cérebro e de lá com transmissão para regiões do tronco encefálico com a substância cinzenta periaquedutal (SCP). A partir SCP poucos neurônios se projetam diretamente para o corno dorsal da medula espinal. Muitos fazem conexões excitatórias com neurônios do bulbo rostroventral, neurônios serotoninérgicos no núcleo magno da rafe e neurônios noradrenérgicos no *locus coeruleus*. Por fim, a quinta etapa é a percepção, que está relacionada com a assimilação dos sinais que chegam à estruturas superiores e são interpretados como dor.

Múltiplas regiões e vias no SNC estão envolvidas no processamento e modulação da dor. Estudos de imagens do encéfalo humano mostraram a existência de redes corticais e subcorticais que são ativadas pela dor, incluindo regiões sensoriais, límbicas (emocionais) e associativas. Com o desenvolvimento da

neurociência, postula-se que, como a percepção e a ação, a emoção é relacionada a circuitos cerebrais distintos³⁴. Ademais, as emoções estão geralmente acompanhadas por respostas autonômicas, endócrinas e motoras esqueléticas que dependem de áreas subcorticais do sistema nervoso, as quais preparam o corpo para a ação³⁵. Um dos primeiros relatórios documentados sugerindo a existência de algum tipo de inibição endógena da dor vem de experiências publicadas de um médico servindo no Exército dos Estados Unidos durante a Segunda Guerra Mundial. Ele observou que a grande maioria dos soldados com ferimentos graves relatou nenhuma dor ou dor moderada e estava relutante em tomar analgésicos. O que foi surpreendente nesta observação foi que as feridas não eram triviais, consistindo em fraturas compostas de ossos longos ou feridas penetrantes no abdômen, tórax ou crânio³⁶. Além disso, esses indivíduos estavam claramente alertas e responsivos, e não em choque, levando Beecher a concluir que “emoções fortes” bloqueiam a dor³⁶. Atualmente sabe-se que o controle endógeno descendente da dor tem início no tronco encefálico e pode ativar diferentes sistemas (opioiédrgico, adenosinérgico, endocanabinoidérgico, noradrenérgico, serotoninérgico etc.). Esses sistemas atuam de diferentes formas no controle da dor, pois são dependentes por sua vez, do tipo de receptor envolvido, do sítio de ação no corno posterior da medula espinal (CPME) e das sinalizações neuroquímicas que regulam o balanço entre facilitação e inibição⁷.

Estudos pré-clínicos vêm identificando os RA_s como potenciais alvos no manejo da dor aguda e crônica⁸. Depois de mais de três décadas de pesquisa em química medicinal, um número considerável de agonistas e antagonistas seletivos para os RA_s foi descoberto e alguns foram avaliados clinicamente, embora ainda aguardando a aprovação regulatória. No entanto, avanços recentes na compreensão dos papéis dos vários subtipos de receptores para adenosina e no desenvolvimento de ligantes seletivos e potentes, trouxeram o objetivo da aplicação terapêutica de moduladores de receptor de adenosina consideravelmente mais perto⁹.

1.1.3 O papel da adenosina e do receptor A₁ na dor

A adenosina é uma substância onipresente, liberada por várias células, como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, plaquetas e células musculares, incluindo neurônios e neuroglia³⁷. Sob condições normais ela é continuamente formada intracelularmente³⁸, todavia em condições que envolvem aumento da demanda

metabólica, hipóxia, inflamação e lesão tecidual locais é produzida em altas concentrações extracelularmente, desempenhando importante papel na regulação da homeostase de muitos sistemas fisiológicos, incluindo sistema cardiovascular, sistema nervoso, sistema renal e sistema imune³⁹. Em particular, níveis elevados de adenosina extracelular foram observados em condições patológicas como epilepsia, isquemia e câncer⁸. A principal fonte de adenosina em estados patológicos é o ATP. Uma vez liberado, o ATP não pode ser transportado de volta para a célula, mas é rapidamente degradado em adenosina por várias ectonucleotidases antes da recaptação. Uma vez no espaço extracelular, a adenosina se liga aos seus receptores acoplados à proteína G que podem inibir ou aumentar a comunicação neuronal⁴⁰.

A maioria dos estudos que avaliam o efeito analgésico da adenosina ou dos agonistas do receptor de adenosina mostrou que essas substâncias são capazes de aumentar o limiar de dor. No entanto, em alguns casos, esses medicamentos podem facilitar a transmissão da dor. Esses achados controversos provavelmente se devem à sinalização e distribuição distintas dos receptores de adenosina⁹.

Existem quatro subtipos conhecidos de receptores para adenosina (RA_s) - referidos como RA₁, RA_{2A}, RA_{2B} e RA₃ - cada um dos quais tem um perfil farmacológico único. Todos os quatro subtipos são membros da superfamília dos receptores acoplados à proteína G. Entre os RA_s humanos, os mais semelhantes são os receptores A₁ e A₃ (49% de similaridade de sequência) e os receptores A_{2A} e A_{2B} (59% de similaridade). Destes receptores, o RA₁ recebeu a maior atenção em estudos relacionados à dor.

Desde as observações iniciais na década de 1970, numerosos estudos demonstraram que a administração sistêmica de agonistas para o RA₁ produz alívio da dor em modelos pré-clínicos, incluindo modelos inflamatórios e neuropáticos que exibem estados de hiper-responsividade, tais como: alodinia e hiperalgisia⁹. Assim, o potencial de agonistas para o RA₁ para representar uma classe de terapêutica para a dor foi considerada em revisões anteriores⁴⁷. Estudos pré-clínicos subsequentes ilustram ainda mais a diversidade de modelos de dor que exibem propriedades antinociceptivas e / ou anti-hiperalgésicas dos agonistas dos RA₁ e continuam a considerar esse potencial⁸. O RA₁ está localizado em terminações nervosas sensoriais periféricas⁴², nas camadas superficiais do corno posterior da medula espinhal⁴⁰, e em sítios supraespinhais específicos dentro do neuroeixo de sinalização de dor⁸. Além de sua localização neuronal, os RA_{1s} também foram identificados na micróglia⁴³ e as

ações inibitórias neste alvo celular também contribuem para a antinocicepção em casos em que o estado de dor envolve ativação e hipertrofia da micróglia⁹.

Recentemente, foi sugerido que a inosina está envolvida em estados de dor aguda e crônica⁴⁴. Evidências mostraram que o metabolismo da adenosina gera inosina, um metabólito com possíveis efeitos biológicos e farmacológicos nos sistemas nervosos periférico e central. A teoria de que a inosina contribui ou medeia os efeitos da adenosina é reforçada por estudos que consideram a inosina como um gatilho natural dos receptores de adenosina. Estudos demonstraram que a inosina liga-se aos receptores de adenosina com afinidades que são tipicamente mais baixas do que a adenosina reduzindo a nocicepção em modelos de dor inflamatória e neuropática crônica⁴⁵. Isso sugere que a inosina atua nos mecanismos neurais e inflamatórios reduzindo a dor. Esses efeitos envolvem também os canais de K⁺ dependentes de voltagem, canais sensíveis a Ca²⁺ e ATP. O envolvimento desses canais iônicos pode ocorrer por meio da ativação do RA₁ ou A_{2A}⁴⁶.

Os receptores para adenosina são os principais alvos da cafeína. A cafeína bloqueia os RA₁ e RA_{2A}⁴⁷. A cafeína é amplamente consumida por seus efeitos estimulantes do sistema nervoso central, como aumento do estado de alerta e diminuição da fadiga. Está presente em diversas bebidas (café, chá, energéticos) e em alguns alimentos (chocolate, sobremesas); também está disponível como medicamento quando usado como estimulante ou adicionado a analgésicos em formulações de venda livre. Em humanos inibe o efeito antinociceptivo do acetaminofeno, amitriptilina, carbamazepina e oxcarbazepina, alopurinol, tramadol, levetiracetam e sumatriptano⁴⁸. Em doses menores que as utilizadas nos medicamentos pode bloquear a anti-nocicepção. Curiosamente a cafeína também bloqueia os efeitos antinociceptivos da acupuntura em ratos em doses que são comparáveis ao que os humanos consomem em um único copo¹². Um estudo clínico randomizado recente demonstrou que a analgesia da acupuntura em humanos é revertida após a ingestão diária moderada de cafeína (101-200mg), consistente com resultados anteriores em animais¹⁴. Além disso, tem sido descrito interferência da cafeína no efeito analgésico da estimulação elétrica nervosa transcutânea⁴⁹, exercícios físicos⁵⁰ e mobilização articular¹¹. O consumo diário estimado é de 168-220 mg/dia na América do Norte e 390-410 mg/dia nos países escandinavos¹³. Pesquisas populacionais nos Estados Unidos confirmam tais níveis de ingestão (193 mg/dia) e observam altas taxas de consumo (85–95% dos adultos)⁴⁸. O café coado contém mais

caféina (56-100 mg/100 ml), seguido por café instantâneo e chá (20–73 mg/100 ml) e coca cola (9–19 mg/100 ml). Os produtos de cacau e chocolate também são fontes importantes de caféina (por exemplo, 5–20mg/100g em bombons de chocolate)¹³.

A relevância clínica da compreensão dos RA_s e seus antagonistas, está relacionada ao fato de que a adenosina pode ser considerada um modulador de ajuste fino da atividade neuronal, que por meio de efeitos sutis causa ações harmônicas na atividade neuronal, essencial para a homeostase. Sempre que esta homeostase é interrompida, a patologia pode ser instalada e antagonismo ou agonismo seletivo do receptor necessário ⁵¹.

Enquanto a medicina normalmente busca a base genética e bioquímica da doença, os avanços na mecanobiologia sugerem que mudanças na estrutura da matriz extracelular podem gerar mecanotransdução e podem contribuir para o desenvolvimento de muitas doenças, incluindo aterosclerose , fibrose , asma , osteoporose , insuficiência cardíaca, e câncer ⁵⁵.

1.1.4 Mecanobiologia

A mecanobiologia é um campo emergente da ciência na interface da biologia, engenharia, química e física. Concentra-se em como as forças físicas e as mudanças nas propriedades mecânicas das células e tecidos contribuem para o desenvolvimento, crescimento, diferenciação ou morte celular, incluindo indução de genes e síntese de proteínas⁵²⁻⁵⁴.

O movimento das articulações, as cargas compressivas na cartilagem e no osso durante o exercício são exemplos de forças mecânicas nos tecidos humanos⁵⁵. Os seres humanos experimentam diversas forças mecânicas de uma ampla variedade de fontes. A gravidade é um exemplo de uma força onipresente que atua sobre o corpo. Outros exemplos de forças mecânicas incluem a pressão sanguínea e tensões de cisalhamento nos vasos devido ao fluxo sanguíneo. De forma similar o tecido pulmonar e o cardíaco são tensionados ciclicamente devido à respiração e às forças mecânicas do fluxo sanguíneo, enquanto os tecidos dérmicos também são submetidos à variadas forças de tração, compressão e cisalhamento^{56,57}.

Medidas de US aplicadas imediatamente antes e após a intervenção manual mostraram diferenças altamente significativas na densidade das fibras de colágeno e orientação na estrutura da matriz na derme, refletindo diferenças palpáveis na tensão

e regularidade⁵⁸. Foi demonstrado em um estudo com fibroblastos humanos do ligamento periodontal que forças contínuas podem ter um efeito maior na indução da expressão gênica durante o processo de remodelação do ligamento periodontal comparado a forças interrompidas com períodos de descanso, demonstrando que a resposta celular pode variar dependendo do tipo, magnitude e duração das forças aplicadas.⁵⁹ Essas cargas no meio celular dos tecidos conjuntivos deformam os fibroblastos e outras células aderentes as quais detectam mudanças nos parâmetros físicos em sua MEC e transduzem essas informações mecânicas em informações químicas integrando esses sinais com estímulos derivados de fatores de crescimento para alcançar mudanças específicas na expressão gênica. O mecanismo molecular pelo qual a célula detecta e responde a sinais mecânicos convertendo-o numa resposta química ou biológica é denominado mecanotransdução⁵³. Experimentos usando géis de colágeno tridimensionais indicaram que a estrutura e composição da MEC também são influenciadas pelas respostas celulares a essas mesmas forças aplicadas ou geradas endogenamente⁶⁰. Os microfilamentos de actina e os filamentos intermediários medeiam efetivamente a transferência de força para o núcleo⁶¹. Esses sistemas de filamentos também agem como fios de sustentação moleculares que enrijecem mecanicamente, enquanto os microtúbulos agem para manter aberta a estrutura do filamento intermediário e estabilizar o núcleo contra a compressão⁶¹. Como linhas de montagem para diversas vias de sinalização, os contatos de adesão de matrizes são agora reconhecidos como os principais locais de cross-talk entre estímulos mecânicos e químicos, com consequências importantes para o crescimento e diferenciação celular.

Uma variedade de canais iônicos em células eucarióticas foram identificadas e são capazes de detectar várias formas de forças mecânicas (ver quadro 1). Esses canais iônicos incluem canais de potencial receptor transitório (TRP) e canais para o Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ dependentes de voltagem. A maioria dos candidatos a estimulação mecânica (o canal TRP em particular) são ativados não apenas por estímulos mecânicos, mas também por produtos químicos, temperatura, osmolaridade e calor (> 27-34 °C)⁶². Entender os mecanismos moleculares dos canais de cátions mecanossensíveis em mamíferos é de suma importância para entender o processo de mecanotransdução e encontrar estratégias terapêuticas potencialmente novas para distúrbios de mecanossensibilidade.

Quadro 1 – Canais iônicos mecano-sensíveis em eucariontes

Família	Subtipos	Ref.
Canais TRP	TRPA1	63
	TRPC1	64
	TRPC6	65
	TRPV1	66
	TRPV4	67
	TRPM4	68
	TRPM7	69
	TRPN	70
	TRPP2	64
Canais de K ⁺	Shaker (Kv1.1)	71
	K ⁺ (BK) ativado por Ca ²⁺	72
	TREK 1/2	73
	TRAAK	74
	HCN2	75
Canais de Na ⁺	Nav 1.5	76
Canais de Ca ²⁺	Tipo-L	77
	Tipo-L	78
	Tipo-L	79
Canais de Cl ⁻	CFTR	80
Proteínas da Família OSCA	ScCSC1, HsCSC1	81
Superfamília DEG/ENaC	C.elegans MEC (MEC-4, MEC-10)	82
	ASIC	83
Outros canais	TMC1/2	84

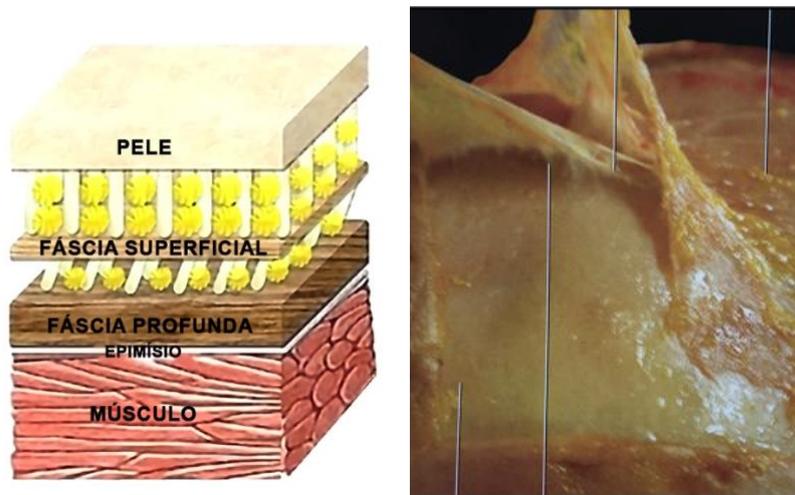
Legenda: TRP – receptor de potencial transiente (do inglês - *Transient receptor potential*, canal de sódio epitelial/ degenerina (do inglês – DEG/Enac – *Degenerin/epithelial sodium Channel*).

1.1.5 O Sistema fascial

A fáscia é um tipo de tecido conjuntivo cujo termo é utilizado na anatomia para descrever faixas ou bandas dissecáveis que revestem as estruturas anatômicas. A fáscia é classificada em superficial e profunda, encontrando-se logo abaixo da derme,

disposta em camadas intrincadas entre o tecido adiposo e o músculo⁶³ (Figura 1). Funcionalmente, o tecido fascial está presente em todo o corpo humano, revestindo todas as partes, dando forma, protegendo, nutrindo, integrando e relacionando todos os sistemas tridimensionalmente. Por esta razão a fáscia é considerada por muitos autores como um sistema, dada sua complexidade e importância vital para a estrutura humana^{64,65}.

Figura 1 – Morfologia anatômica e topografia da fáscia



Legenda: Figura A – Desenho esquemático da localização anatômica da fáscia superficial e profunda Figura B – Fáscia superficial e profunda em uma peça anatômica. Fonte: Stecco, 2015⁶³

A fáscia assim como todos os tecidos conjuntivos, apresenta três componentes principais, sendo eles: as células, as fibras e a matriz extracelular (MEC). As células respondem pelas propriedades metabólicas do tecido, as fibras pelas propriedades mecânicas do tecido, e a MEC pela manutenção do ambiente biológico fornecendo proteção, suporte e condições para o funcionamento das células. A MEC é composta de água, plasma, linfa e moléculas entre elas o ácido hialurônico. É uma matriz gelatinosa viscosa e elástica (figura 2).

Figura 2 – Imagem in vivo da MEC



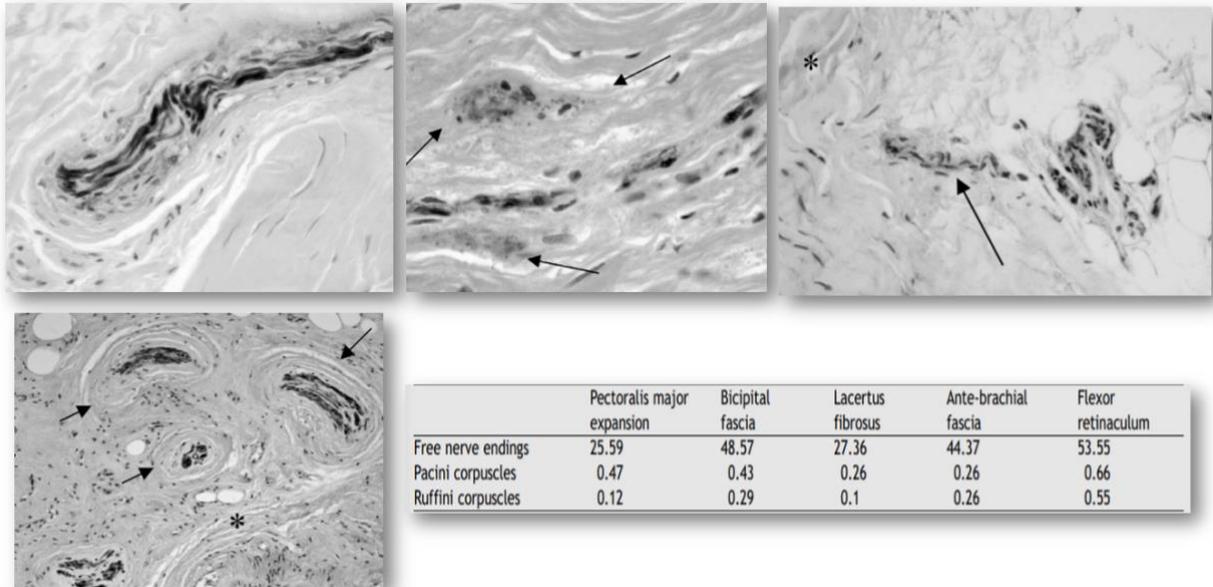
Legenda: Imagem da fascia superficial aumentada 25 vezes.
 Fonte: Guimberteau, 2015⁶⁶.

Sob condições de carga aumentada, exibem respostas nítidas às forças aplicadas, incluindo maior remodelagem das matrizes do tecido conjuntivo e aumento da proliferação de fibroblastos⁶⁷. A célula chamada de fibroblasto é a principal célula do tecido conjuntivo e produz continuamente fibrilas de colágeno, sendo responsável pela remodelagem e manutenção da MEC⁶⁸. Cada fibroblasto responde prontamente a várias entradas de estímulos, sejam mecânicos (por exemplo, forças compressivas, tração ou cisalhamento) ou químicas (por exemplo, citocinas, hormônios ou hipóxia), influenciando assim o comportamento das células adjacentes. A realização das atividades da vida diária mantém a fluidez da matriz através do movimento. Já o sedentarismo pode gerar aderências em função da diminuição da hidratação e aumento da viscosidade resultando em diminuição do deslizamento e disfunção dos tecidos miofasciais⁶⁹.

A pesquisadora Ida Rolf, em seu método de integração estrutural foi uma das pioneiras a descrever as propriedades da fáscia e evidenciar sua importância clínica. Rolf preconizava que a fáscia reage a aplicação de pressão, energia e calor, mudando sua consistência do estado sólido para o estado solúvel⁷⁰. Estudos intervencionistas demonstraram os efeitos do seu método na diminuição da rigidez do tecido fascial e aumento da elasticidade, assim como diminuição na dor lombar não específica^{70,71}.

Para compreender os mecanismos desse estudo é importante conhecer histologicamente esse tecido. Recentes pesquisas já reconheceram a presença de terminações nervosas mecanorreceptoras e nociceptoras na fáscia de várias regiões anatômicas (figura 3). Diferentes fascias apresentam diferentes tipos e densidades de inervações mostrando seu potencial envolvimento com a dor^{72,73}.

Figura 3: Presença de inervação na fáscia.



Legenda: Imagens histológicas demonstrando a presença de inervação na fáscia de várias regiões corporais, desde terminações nervosas livres a corpúsculos de Pacini e Ruffini. Fonte: Stecco et al.,2007⁷⁴.

1.1.6 Técnica de reorganização miofascial (RMF)

A técnica de RMF é uma técnica de terapia manual que foi recentemente desenvolvida e está sendo aplicada em estudos experimentais e clínicos^{19,75,76}. A RMF é uma técnica que utiliza apenas contato manual, sendo considerada um método simples, de baixo custo e não invasivo que reorganiza as estruturas miofasciais, aplicando cargas mecânicas combinadas de compressão tangencial sustentada, tração no sentido da restrição tecidual (densificação) e cisalhamento mobilizando o tecido em meia lua sem perder a tensão.

Mudanças dinâmicas na fáscia, induzidas pela deformação mecânica manual, podem justificar os resultados observados na aplicação da técnica. A fáscia apresenta propriedades viscoelásticas e piezoelétricas que respondem às cargas mecânicas impostas, com uma cascata de eventos eletroquímicos⁷⁷. A RMF deriva de outras técnicas nas quais as cargas manuais são aplicadas gradualmente e tangencialmente

com o objetivo de mobilizar o tecido mole ^{19,78,79}. O terapeuta é guiado pela resposta do corpo do paciente para determinar a direção da carga e sua intensidade e duração.

Em 2021 a técnica foi utilizada em estudo pré-clínico com camundongos *Swiss* macho, onde a fascia tóraco-lombar dos animais foi inflamada segundo o modelo de inflamação com carragenina. Foram formados 4 grupos (carragenina sem tratamento, carragenina com tratamento RMF, salina sem tratamento, salina + tratamento RMF). Os animais foram depilados e anestesiados. O protocolo de tratamento foi aplicado 6, 24 e 48h após a inflamação. A técnica RMF foi aplicada sobre a fascia tóraco lombar do animal, com pressão manual à 45 graus de inclinação e vetores de força respeitando o sentido das fibras das 3 lâminas do tecido alvo. Os autores utilizaram 3 diferentes cargas em 3 momentos diferentes com diferentes tempos: carga compressiva 3min., carga de tração por 10 min., carga de cisalhamento por 7 min. As amostras de tecido do tecido conjuntivo da região tóraco-lombar foram cuidadosamente destacadas do músculo subjacente próximo aos processos espinhosos L4-L5. Os níveis de citocinas e proteínas foram analisados. Como resultado foram encontrados níveis significativamente maiores de TGF- β 1 e IL-4 no grupo Car + RMF quando comparados com o grupo salina. Não foi encontrada diferença entre os grupos para IL-6, TNF e MCP-1. Curiosamente, os níveis de proteína Ly-6G foram significativamente menores nos grupos Car + RMF quando comparados aos grupos solução salina ou solução salina + RMF. Concluiu-se com o estudo que, a MFS pode ser um tratamento seguro para auxiliar no manejo de processos inflamatórios agudos em condições de dor ortopédica, pois não provoca aumento da inflamação, mas promove um ambiente pró-resolutivo no tecido conjuntivo tratado⁷⁶.

Em 2019 a técnica RMF foi aplicada em um estudo clínico em um grupo de 8 indivíduos, com o objetivo de verificar se a RMF altera a oxigenação tecidual do músculo trapézio (MT). Os indivíduos submetidos à técnica não apresentavam sintoma de dor no dia da avaliação. As alterações na oxigenação muscular foram medidas por espectroscopia no infravermelho (NIRS) em MT antes e após uma única sessão de RMF por 15 min. O protocolo de RMF consistiu em pressões, alongamentos e deslizamento miofascial das fibras da MT superior, média e inferior. Nos resultados verificou-se um aumento significativo do índice de saturação tecidual (ITT) no músculo trapézio quando comparado os tempos pré e pós-intervenção. Além disso, foi observado aumento dos níveis de O₂Hb, tHB e diminuição da HHb. Assim, concluiu-

se que a RMF aplicada no músculo trapézio aumentou o ITT, o que reflete na oxigenação muscular periférica em indivíduos sem dor no dia da avaliação⁷⁵.

Em 2021 um estudo quase experimental teve como objetivo investigar se a RMF melhora a oxigenação muscular periférica em pacientes com cervicalgia inespecífica. Cinquenta participantes (mulheres: 36, homens: 14) grupo experimental (GE: n = 25, submetido a RMF) ou grupo controle (GC: sem intervenção de RM). A oxigenação TM foi medida usando espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) antes e após uma única intervenção. A incapacidade cervical e a cervicalgia foram mensuradas pelo índice de incapacidade cervical, limiar de pressão da dor e a intensidade da dor. Todos os participantes foram avaliados e reavaliados após 10 min. Os resultados revelaram que imediatamente após 10 min. de RMF, o GE exibiu aumento no nível de oxi-hemoglobina das fibras médias do MT, concluindo que a aplicação de RM por 10 min. aumenta o nível de oxi-hemoglobina tecidual do MT⁸⁰.

Em 2022 mais um estudo clínico sobre a RMF buscou comparar a técnica isoladamente ao uso associado com a cinesioterapia. A cinesioterapia e a RMF têm demonstrado efeitos positivos na redução da dor crônica e na melhora da função dos membros superiores. A hipótese dos autores é que essas técnicas podem maximizar os resultados e reduzir o tempo de tratamento das disfunções dos membros superiores em sobreviventes de câncer de mama. Os participantes foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos: grupo intervenção (RMF + cinesioterapia) e grupo sham (massagem tradicional + cinesioterapia). Foram realizadas seis sessões de tratamento (uma vez por semana) e três avaliações (Semana 1, 3 e 6). Os instrumentos de avaliação da dor e da funcionalidade foram a Escala Visual Analógica, o diagrama de dor corporal, o questionário de deficiências do braço, ombro e mão e a goniometria do ombro. Os resultados mostraram que a RMF associada à cinesioterapia melhora a dor crônica e a funcionalidade dos membros superiores de sobreviventes de câncer de mama.

Pela natureza complexa da abordagem com as técnicas manuais envolvendo múltiplos fatores biopsicossociais e vários elementos inerentes ao contexto de cada atendimento, é improvável determinar um único mecanismo subjacente ao desfecho da intervenção, porém acredita-se que a pesquisa com foco em mecanismos irá fortalecer e aprimorar a prática clínica por meio de abordagens personalizadas, baseadas em avaliações clínicas, referências e literatura disponível. Nesse sentido esse projeto pode resultar em:

Mais dados sobre os sistemas endógenos de controle da dor anti-hiperalgésica de origem inflamatória, seletivamente o RA₁ contribuindo com os estudos sobre os circuitos neurofisiológicos da dor; mais evidências sobre uma nova técnica de TM de fácil aplicação, baixo custo e replicável; determinar o melhor tempo para a melhor resposta anti-hiperalgésica, aumentando a confiabilidade e eficiência nos tratamentos fisioterapêuticos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-hiperalgésico da técnica de RMF e o envolvimento dos RA_s periférico, espinal e supra espinal nesse efeito, em camundongos com inflamação periférica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em camundongos submetidos a injeção intraplantar de CFA pretende-se analisar:

- O efeito da aplicação da técnica de RMF na pata por diferentes tempos sobre a hiperalgesia mecânica e edema;
- Especificamente o envolvimento dos RA periférico, espinal e supra espinal sobre o efeito anti-hiperalgésico da RMF na pata, por meio da administração de cafeína;
- Seletivamente o envolvimento do RA₁ periférico e espinal sobre o efeito anti-hiperalgésico da RMF na pata, por meio da administração de 8-Ciclopentil-3-dipropilxantina (DPCPX).

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

A pesquisa se caracteriza por ser um estudo experimental e de natureza quantitativa.

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

As seguintes substâncias foram utilizadas: CFA (Sigma Chemical Co., St Luis, MO, EUA), salina (LBS Laborasa Indústria Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil); isoflurano (Biochimico, Itatiaia, RJ, Brasil), cafeína, DPCPX - 8-Ciclopentil-3-dipropilxantina (Química Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e dexametasona (Decadron – Hypofarma). Simultaneamente, foram utilizados os seguintes equipamentos: Monofilamento de von Frey de 0,6g da VFH (Chicago, EUA); Balança digital alta precisão eletrônica (Sf-400 1g a 10 Kg, Adria laboratórios, PR, Brasil); Equipamento de anestesia inalatória (Scienlabor Equipamentos Industriais LTDA, Ribeirão Preto - SP); equipamento digital micrômetro.

Os experimentos foram realizados nos setores de Comportamento, Bioquímica e Biologia Molecular do laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx) da UNISUL, localizado no Campus Universitário Grande Florianópolis, unidade Pedra Branca, Bloco I2.

3.3 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos utilizando camundongos Swiss fêmeas pesando de 25 a 35g, idade 8 a 14 semanas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, os quais foram mantidos no Laboratório de Neurociência Experimental (LaNEx), da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16cm), com grades de aço inox e alojados conforme normas do laboratório. O n=240 animais, mantidos 15 animais por caixa, os quais permaneceram em ambiente aclimatado a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, no ciclo 12 h-claro/12 h-escuro (claro a partir das 6h:00min), com acesso a ração e água ad

libitum. Os animais foram homoganeamente distribuídos entre os grupos e aclimatizados no laboratório por pelo menos 1h antes dos testes e experimentos.

3.4 CÁLCULO DA AMOSTRA

O número de animais utilizados foram o mínimo necessário para demonstrar os efeitos obtidos pelo tratamento. Diante disso, neste estudo foi utilizado $n = 8$ animais por grupo, com base no cálculo de Wayne and Chad ⁸¹, que apresenta as seguintes equações, para a obtenção de um coeficiente de confiança de 95. Sendo assim, o cálculo utilizado para determinar o $n = 8$ por grupo:

$$n = \left\{ \frac{[(z_{\alpha} + z_{\beta}) \cdot s]}{\sigma} \right\}^2$$

O teste baseia-se no cálculo do intervalo de confiança da diferença entre as médias ou entre proporções (σ), do desvio-padrão (s) do parâmetro alfa que é a probabilidade aceitável de achar uma diferença quando na verdade ela não existe (erro do Tipo I; falso verdadeiro; quanto menor for o alfa escolhido, maior será a amostra necessária) e do parâmetro beta que é o risco aceitável de estar perdendo uma diferença que realmente existe (erro do Tipo II). Segue um roteiro para o cálculo:

1. O valor de alfa foi fixado em 0,05. Assim o valor de z alfa baseado na tabela de valores de z para distribuição bi-caudal (twotailed) é 1,96.

2. O valor de beta foi fixado em 0,10. Assim o valor de z beta baseado na tabela de valores de z (distribuição unicaudal) é 1,28.

3. O valor da diferença entre as médias dos grupos como sendo pelo menos 40% (baseado em dados experimentais do nosso laboratório). Experimentos biológicos têm embutido um erro da ordem de 10-15% (resultantes de variações individuais, erro no procedimento cirúrgico, erros de dosagem, etc.), diferenças entre dois grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo podem aumentar a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II.

4. O valor do desvio padrão como sendo em média 35% do valor das médias. (baseado em dados experimentais do nosso laboratório).

Assim, aplicando os valores a fórmula acima temos:

$$n = \left\{ \frac{[(1,96 + 1,28) \cdot 35]}{40} \right\}^2$$

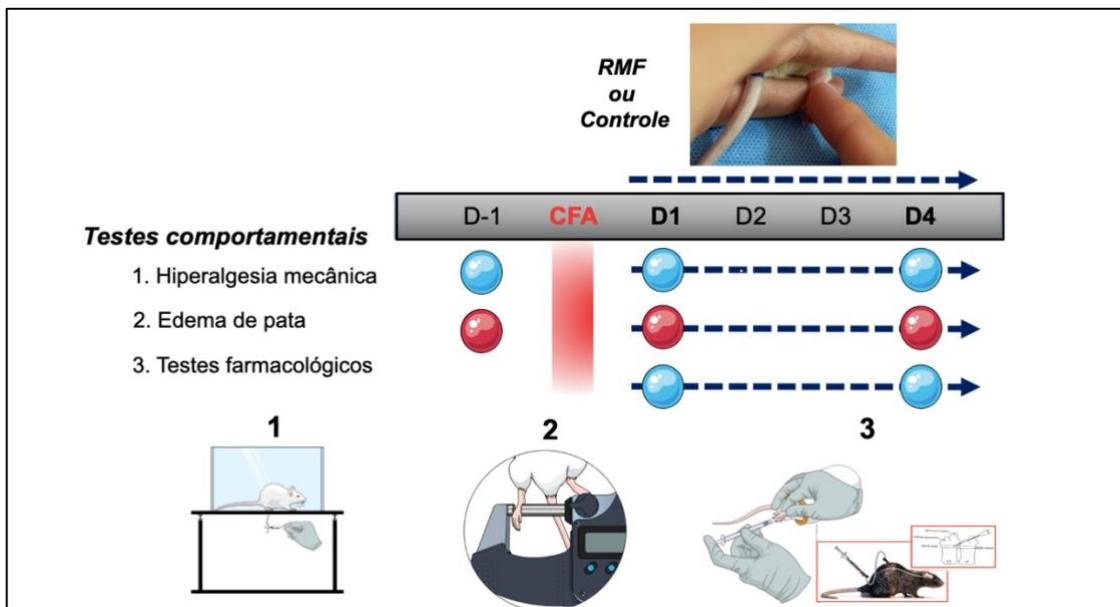
$$n = 8$$

Com isso, para garantir que os dados que foram obtidos nos experimentos sejam adequados foram necessários 8 animais por grupo.

3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Inicialmente, os animais foram submetidos a injeção intraplantar (i.pl.) de CFA para com o intuito de induzir o modelo de inflamação da pata. Um dia antes da indução da inflamação, foram coletados dados basais, tais como: peso corporal, resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico do monofilamento de von Frey (vF) e espessura da pata. Vinte quatro horas após a inflamação da pata, diferentes grupos de animais foram tratados com a técnica de RMF na região da pata inflamada por diferentes tempos (3, 9 e 15 min.), a fim de determinar o melhor tempo resposta (dosimetria) que resulta em maior efeito anti-hiperalgésico. Um grupo separado de animais foi tratado com dexametasona, a fim de estabelecer um grupo controle positivo (Figura 4).

Figura 4 – Sequência do protocolo de estudo.



Legenda: Delineamento do estudo. D, dias; RMF, reorganização miofascial; CFA, do inglês – *Complete Freund' Adjuvant*.

Após a determinação do melhor tempo da técnica de RMF no teste de VF, a investigação dos demais desfechos foi realizada utilizando somente um grupo de animais tratados com a técnica. A participação dos receptores para adenosina foi triada inicialmente por meio do pré-tratamento com um antagonista não específico (cafeína) administrado no primeiro e quarto dia após a injeção de CFA em diferentes sítios (i.p.; i.t. e i.pl.) de modulação da dor, com o intuito de confirmar o envolvimento dos receptores adenosinérgicos no efeito anti-hiperalgésico da técnica de RMF. Por fim, a investigação da participação seletiva do envolvimento do RA₁ no efeito anti-hiperalgésico da técnica de RMF, foi realizada por meio do pré-tratamento com DPCPX em outros grupos de animais sobre os mesmos sítios dos animais tratados com cafeína.

3.5.1 Experimento 1: avaliação do efeito da aplicação da técnica de RMF na pata por diferentes tempos sobre a hiperalgisia mecânica e edema.

Quadro 2 – Grupos de animais 1 - avaliação do efeito da aplicação da técnica de RMF na pata por diferentes tempos sobre a hiperalgisia mecânica

Grupo	n	Inoculação	Tratamento
1	n=8	CFA	RMF (Falso) controle
2	n=8	CFA	RMF 3 min. (isoflurano)
3	n=8	CFA	RMF 9 min. (isoflurano)
4	n=8	CFA	RMF 15 min. (isoflurano)
5	n=8	CFA	Saline (10ml/kg., i.p.)
6	n=8	CFA	Dexametasona (10ml/kg., i.p.)

3.5.2 Experimento 2: avaliação do envolvimento dos RA_s periféricos, espinais e supra espinais sobre o efeito anti-hiperalgésico da RMF na pata.

Quadro 3 – Grupos de animais 2 - Análise da administração de cafeína.

Grupo	n	Inoculação	Tratamento
1	n=8	CFA	Salina (10ml/kg., i.p.) + Controle (9 min.)
2	n=8	CFA	Cafeína (10mg/kg., i.p.) + Controle (9 min.)
3	n=8	CFA	Salina (10ml/kg., i.p.) + RMF (9 min.)
4	n=8	CFA	Cafeína (10mg/kg., i.p.) + RMF (9 min.)
5	n=8	CFA	Salina (Nacl 0,9% 20µl, i.pl.) + Controle (9 min.)
6	n=8	CFA	Cafeína (150nmol/20µl, i.pl.) + Controle (9 min.)
7	n=8	CFA	Salina (Nacl 0,9% 20µl, i.pl.) + RMF (9 min.)
8	n=8	CFA	Cafeína (150nmol/20µl, i.pl.) + RMF (9 min.)
9	n=8	CFA	Salina (Nacl 0,9% 5µl, i.t.) + Controle (9 min.)
10	n=8	CFA	Cafeína (150nmol/5µl, i.t.) + Controle (9 min.)
11	n=8	CFA	Salina (Nacl 0,9% 20µl, i.t.) + RMF (9 min.)
12	n=8	CFA	Cafeína (150nmol/5µl, i.t.) + RMF (9 min.)

3.5.3 Experimento 3: avaliação do envolvimento do RA₁ periférico e espinal sobre o efeito anti-hiperalgésico da RMF na pata.

Quadro 4 – Grupos de Animais 3 – avaliação do envolvimento do RA₁ periférico e espinal sobre o efeito anti-hiperalgésico da RMF na pata

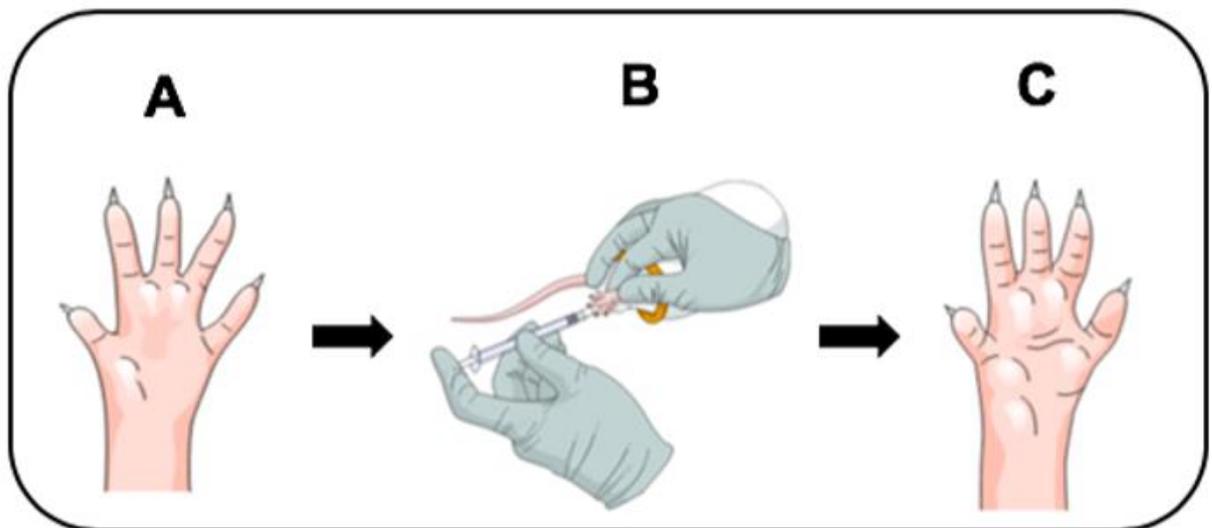
1	n=8	CFA	Salina (Nacl 0,9% 20µl, i.pl.) + Controle (9 min.)
2	n=8	CFA	DPCPX (10nmol/20µl, i.pl.) + Controle (9 min.)
3	n=8	CFA	Salina (Nacl 0,9% 20µl, i.pl.) + RMF (9 min.)
4	n=8	CFA	DPCPX (10nmol/20µl, i.pl.) + RMF (9 min.)
5	n=8	CFA	Salina (Nacl 0,9% 5µl, i.t.) + Controle (9 min.)
6	n=8	CFA	DPCPX (10nmol/5µl, i.t.) + Controle (9 min.)
7	n=8	CFA	Salina (Nacl 0,9% 20µl, i.t.) + RMF (9 min.)
8	n=8	CFA	DPCPX (10nmol/5µl, i.t.) + RMF (9 min.)

3.6 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

3.6.1 Modelo inflamatório animal de hiperalgesia

Nesta pesquisa foi utilizado o modelo animal de indução de inflamação periférica, por meio da injeção i.pl. contendo 20 μ l de solução de CFA a 50%. Este modelo produz um estado hiperalgesia mecânica persistente ⁸² (Figura 5).

Figura 5 - Ilustração da injeção i.pl. de CFA (50%) na pata posterior direita do camundongo



Legenda: Representação da injeção de CFA na pata posterior direita do camundongo. Pata do camundongo naíve (Painel A). Injeção intraplantar (i.pl.) de 20 μ l de CFA 50% (Painel B). Pata do camundongo 6h após a injeção i.pl. de CFA (Painel C).

Fonte: <https://mindthegraph.com>

3.6.2 Mensurações de hiperalgesia

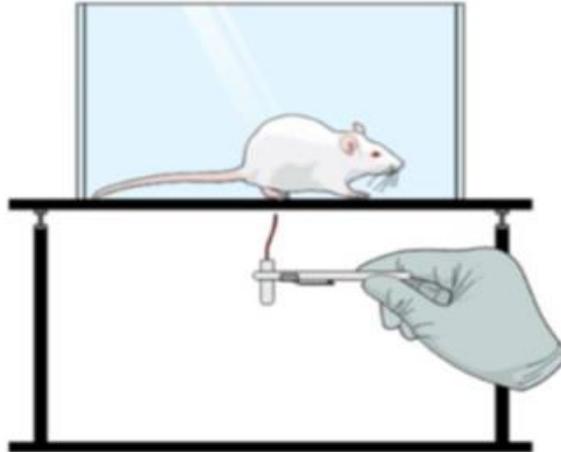
O teste foi aplicado utilizando uma plataforma (70 x 40 cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com

tampa, posicionada sobre a plataforma. A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de *von Frey* (0,6g). A frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de *von Frey*, foi registrada em porcentagem e utilizada como indicativo de resposta hiperalgésica. Anteriormente à administração de CFA, os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal, sendo que, apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta em torno de 20% foram selecionados.

O filamento foi aplicado na superfície plantar da pata posterior direita tendendo a alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro patas estiveram acomodadas sobre a tela; foi considerada resposta positiva o levantamento da pata posterior direita, na qual foi previamente administrado o CFA i.pl. (Figura 6).

A hiperalgesia mecânica foi avaliada 24h antes da inflamação da pata e após o tratamento pela RMF nos tempos 3, 9 e 15 min. Uma vez determinado o melhor tempo para aplicação da técnica, seguiu-se a segunda etapa do experimento e o *von frey* foi aplicado 24h e 96h após o tratamento com RMF. Analise em duas fases (24h e 96h) se deve ao fato de que durante as fases inflamatórias há uma predominância de diferentes tipos celulares. Na fase inicial neutrófilos são as células predominantes, na fase tardia, macrófagos são mais prevalentes⁸³.

Figura 6 – Avaliação da hiperalgesia mecânica



Legenda: Representação do teste comportamental de hiperalgesia mecânica denominado teste do filamento de von Frey. O animal fica ambientado individualmente sobre uma plataforma de arame. A frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de *von Frey*, será registrada em porcentagem e utilizada como indicativo de resposta hiperalgésica.

Fonte: <https://mindthegraph.com>

3.6.3 Mensuração do edema

A avaliação do edema foi realizada através da mensuração da espessura da pata direita (porção medial) por meio de um micrômetro digital ⁸⁴, conforme Figura 6. Os resultados foram expressos com a diferença entre a espessura da pata direita e o valor basal (antes do CFA) da mesma pata. As avaliações foram realizadas nos tempos descritos anteriormente na (Figura 7). O edema da pata do camundongo foi avaliado 24h antes da inflamação da pata e após o tratamento pela RMF nos tempos 3,9 e 15 min. Uma vez determinado o melhor tempo para aplicação da técnica, seguiu-se a segunda etapa do experimento e o von Frey foi aplicado 24h e 96h após o tratamento com RMF.

Figura 7 – Avaliação do edema da pata do camundongo por meio do micrômetro digital.



Legenda: Representação da mensuração do edema da pata direita do animal através do micrômetro digital.

Fonte: <https://mindthegraph.com>

3.6.4 Tratamento com RMF

O procedimento de RMF foi aplicado sempre pelo mesmo fisioterapeuta com 32 anos de experiência clínica e treinamento em intervenções voltadas ao sistema fascial, como o método Rolf, com realização prévia do curso para manejo de animais. Durante o procedimento o animal foi anestesiado com isoflurano a 2% a 100% de oxigênio. O protocolo manual utilizado foi conduzido usando uma abordagem adaptada daquela descrita por França e colaboradores¹⁸ realizou uma translação do tratamento realizado em humanos para camundongos. Assim como no estudo anterior, o presente estudo utiliza uma técnica manual com similaridades no método Rolf de integração estrutural, no entanto, não reflete toda a profundidade e complexidade desse método (que foi desenvolvido para humanos). Este protocolo foi baseado em estudos prévios sobre anatomia e dissecação do complexo fascial em camundongos, com o objetivo de preservar a integridade da técnica aplicada a humanos, mas buscando encontrar a correspondência mais adequada entre as características do tratamento humano quando aplicado a camundongos.

Será aplicado da seguinte forma: Com o animal sedado e posicionado em decúbito ventral, o fisioterapeuta posiciona a superfície dorsal pata traseira direita do

animal sobre a interfalangeana distal da sua mão esquerda, deixando exposta e livre de tensão a superfície plantar da pata do animal. Após o posicionamento inicial, o fisioterapeuta toca com a polpa do 3ºdedo da mão direita a fáscia plantar do animal. Após alguns segundos de contato e aderência ao tecido, aplica-se a técnica em dois momentos: 1- carregamento tensional sustentado da fáscia plantar, através de uma tração tangencial no sentido crânio caudal e 2- micro movimentos latero-laterais descrevendo uma pequena curva 180 graus (meia lua) que provoca cisalhamento da fáscia plantar do animal. Esses são princípios do tratamento voltado ao sistema fascial de humanos (Figura 8).

Figura 8 – Protocolo de terapia manual com a técnica de RMF.



Legenda: Imagem da aplicação da técnica RMF em humano adaptada para a pata de camundongo.

3.6.5 Investigação do envolvimento dos RA_s no efeito anti-hiperalgésico da reorganização miofascial

3.6.5.1 Avaliação do efeito da administração de cafeína em diferentes sítios modulatórios da dor na analgesia causada pela RMF

A participação dos receptores adenosinérgicos no efeito anti-hiperalgésico da RMF foi investigada em camundongos pela administração de salina (10mL/kg; 5 µL/sítio; 20µL/sítio, administrada i.p.; i.t.; i.pl. respectivamente) ou cafeína (um antagonista não seletivo de receptores para adenosina, (10mg/kg; 150nmol/sítio; 150 nmol/sítio, administrada i.p.; i.t.; i.pl. respectivamente)⁸⁵, 20 min. antes do controle ou RMF. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 min. após os tratamentos. Nesse experimento foram utilizados os seguintes grupos: (n=8): (1) CFA + Salina i.p.; i.t.; i.pl.

+ Sham RMF; (2) CFA + Cafeína i.p.; i.t.; i.pl. + Sham RMF; (3) CFA + Salina i.p.; i.t.; i.pl. + RMF; (4) CFA + Cafeína i.p.; i.t.; i.pl. + RMF.

3.6.5.2 Avaliação do papel do RA₁ em sítios periférico e espinal na analgesia causada pela RMF

A participação do RA₁ no efeito anti-hiperalgésico na manipulação do tecido fascial foi investigada em camundongos pela administração de salina (5 µL/sítio; 20µL/sítio, administrada i.t.; i.pl. respectivamente) ou DPCPX (um antagonista seletivo para RA₁, (10 nmol ou 10 nmol; administrados i.t. ou i.pl. respectivamente) ⁸⁵, 20 min. antes do controle ou RMF. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 min. após os tratamentos. Nesse experimento foram utilizados os seguintes grupos: (n=8): (1) CFA + Salina i.t. ou i.pl. + Sham RMF; (2) CFA + Cafeína i.t. ou i.pl. + Sham RMF; (3) CFA + Salina i.t. ou i.pl. + RMF; (4) CFA + Cafeína i.t. ou i.pl. + RMF.

3.7 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Quadro 5 – Variáveis do estudo

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Hiperalgesia mecânica	Dependente	Quantitativa contínua	(Frequência de retirada da pata) Média ± desvio padrão
Edema de pata	Dependente	Quantitativa contínua	(Espessura da pata em µm) Média ± desvio padrão
Técnica de RMF	Independente	Qualitativa	Tempo 3min, 9min e 15min. Sim ou não
Cafeína	Independente	Qualitativa	Sim ou não
DPCPX	Independente	Qualitativa	Sim ou não

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram inicialmente tabulados em uma planilha do programa Microsoft Excel. Para verificar a distribuição dos dados foi utilizado o teste estatístico Shapiro-wilk. Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão (distribuição paramétrica) ou mediana e intervalo interquartil (distribuição não-paramétrica). A análise de variância (ANOVA) de duas vias foi usada caso os dados tenham sido paramétricos seguidas pelo post hoc testes Student-Newman-Keuls ou o teste de Bonferroni. Caso a distribuição tenha sido não-paramétrica o teste de Kruskal Wallis foi utilizado. Os valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o software GraphPad Prism 9.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA Registro Nº 21.021.4.01IV (Anexo A). Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e exigências estabelecidas em *The Guide for the care and use of experimental animals (Canadian Council on Animal Care)*.

Além disso, foi seguido o princípio dos 3R's: substituição (do inglês *replacement*); redução (do inglês *reduction*); e refinamento (do inglês *refinement*). Sendo o número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos o mínimo necessário para demonstrar o efeito do tratamento recebido. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes, assim como o guia ARRIVE (do inglês *animal research reporting in vivo experiments*), para estudos não clínicos (Anexo B).

Após os experimentos os animais foram eutanasiados obedecendo as disposições da Resolução no. 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), de 20/06/2002, e de forma indolor e assistida pelo Médico Veterinário responsável pelo Biotério Experimental do Laboratório de Neurociência Experimental, Geraldo Jorge Severgini Bernardes, Matrícula na UNISUL-7068 e CRMV 0452-SC, por dose anestésica de uma mistura de xilazina e cetamina.

4. ARTIGO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo original. As seções de Resultados, Discussão encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS no final do trabalho contemplam somente as citações apresentadas na estrutura da dissertação, uma vez que o artigo tem suas referências apresentadas na sua própria composição.

Caffeine prevents the plantar fascia manipulation-induced analgesia in a mouse model of peripheral inflammation: the role of peripheral and spinal adenosine A₁ receptor

Maria Eugenia Ortiz, ^a Larissa Sinhorim, ^a Bruna Hoffmann de Oliveira, ^a Rafaela Hardt da Silva, ^a, Gabriel Melo de Souza, ^a Edsel Balduino Bittencourt, ^{a,b} Gianluca Bianco, ^{c,d} Robert Schleip, ^{e,f} Daniel Fernandes Martins^{a,*}

^a *Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Brazil*

^b *Coastal Health Institute, Jacksonville, FL 32224, USA*

^c *Research Laboratory of Posturology and Neuromodulation RELPON, Department of Human Neuroscience, Sapienza University, 00147 Rome, Italy*

^d *Istituto di Formazione in Agopuntura e Neuromodulazione IFAN, 00147 Roma, Italy*

^e *Department of Sport and Health Sciences, Technical University of Munich, 80799 Munich, Germany*

^f *Department for Medical Professions, DIPLOMA University of Applied Sciences, 37242 Bad Sooden-Allendorf, Germany*

***Corresponding**

author:

Daniel F. Martins, PhD, Experimental Neuroscience Laboratory, Post-Graduate Program of Health Science, Southern University of Santa Catarina, Campus Grande Florianópolis, Palhoça, Santa Catarina, Brazil. Phone: +55 48 3279-1144; E-mail: daniel.f.martins@institutoanimaeducacao.org.br

Abstract

The role of adenosine receptors in fascial manipulation-induced analgesia has not yet been investigated. The purpose of this study was to evaluate the involvement of the adenosine A₁ receptor (A₁R) in the antihyperalgesic effect of plantar fascia manipulation (PFM) in mice with peripheral inflammation. Mice injected with Complete Freund's Adjuvant (CFA) underwent behavioral, i.e. mechanical hyperalgesia and edema. The mice were subjected to PFM for 3, 9 or 15 minutes. Response frequency to mechanical stimuli was assessed at 24 and 96 hours after plantar CFA injection. The adenosinergic receptors was assessed by systemic (intraperitoneal, i.p.), central (intrathecal, i.t.), and peripheral (intraplantar, i.pl.) administration of caffeine. The participation of the A₁R was investigated using the 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine - DPCPX, a selective A₁R subtype antagonist. PFM inhibited mechanical hyperalgesia induced by CFA injection and did not reduce paw edema. Furthermore, the antihyperalgesic effect of PFM was prevented by pretreatment of the animals with caffeine given by i.p., i.pl., and i.t. routes. In addition, i.pl. and i.t. administrations of DPCPX blocked the antihyperalgesia caused by PFM. These observations indicate that adenosine receptors mediate the antihyperalgesic effect of PFM. Inhibition of PFM antihyperalgesia by caffeine suggests a more detailed consideration of fascia manipulation-caffeine interactions in humans is warranted.

Key words: Inflammatory pain, Manual therapy, Myofascial release.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a técnica de manipulação da fáscia plantar realizado por meio da técnica de RMF em camundongo causou redução da hiperalgesia mecânica em um modelo animal e dor nociceptiva de origem inflamatória. Ficou estabelecido que o tempo custo benefícios foi de 9 min de realização da terapia. Nossos resultados representam um avanço que aproxima a ciência da prática clínica, ampliando o conhecimento científico e prático dos profissionais fisioterapeutas no uso da terapia manual, diminuindo o empirismo das técnicas manipulativas e conferindo maior confiabilidade aos tratamentos fisioterapêuticos.

Este estudo também demonstrou que o efeito anti-hiperalgésico da RMF, é pelo menos em parte, mediado pelos RA₁, tanto periféricos como central. Esse achado estende os dados da literatura que já demonstraram que adenosina está implicada na analgesia por eletroacupuntura, TENS, exercício físico e mobilização articular. Interessantemente, é o fato de que a ingestão de cafeína nessas modalidades não farmacológicas precisa ser considerada e agora também na manipulação da fascia. Neste sentido, os níveis da ingestão de cafeína exigem atenção clínica pois impactam diretamente na ação das terapias de controle da dor. Os resultados da RMF aplicada à dor nociceptiva de origem inflamatória são promissores, pelo fato de ser uma abordagem não farmacológica, de baixo custo e de fácil aplicação. Futuros estudos clínicos poderão validar seus benefícios.

REFERÊNCIAS

1. Carvalho R, Maglioni CB, Machado GB, Araújo JE de, Silva JRT da, Silva ML da. Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil : a national internet-based survey study. *Brazilian J Pain*. 2018;1(4):331–8.
2. Machado LAC, Telles RW, Benseñor IM, Barreto SM. Prevalence of pain and associated factors in Brazilian civil servants : an introductory analysis using baseline data from the ELSA-Brasil cohort. Vol. 4, *Pain Reports*. 2019.
3. Henschke N, Kamper SJ, Maher CG. The epidemiology and economic consequences of pain. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(1):139–47.
4. Moffat R, Rae CP. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth Intensive Care Med* [Internet]. 2011;12(1):12–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpaic.2010.10.011>
5. Bingel U, Tracey I, Ritter C, Hebart MN, Wolbers T, Bingel U. Imaging CNS Modulation of Pain in Humans Imaging CNS Modulation of Pain in Humans. *Physiology*. 2008;23:371–80.
6. Tracey WD. *Current Biology*. 2017;123–38.
7. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203–10.
8. Vincenzi F, Pasquini S, Borea PA, Varani K. Targeting adenosine receptors: A potential pharmacological avenue for acute and chronic pain. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1–21.
9. Sawynok J. Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience* [Internet]. 2016;338(November):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.031>
10. Goldman N, Chen M, Fujita T, Xu Q, Peng W, Liu W, et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. *Nat Neurosci*. 2010 Jul;13(7):883–8.
11. Martins DF, Mazzardo-Martins L, Cidral-Filho FJ, Stramosk J, Santos ARS. Ankle joint mobilization affects postoperative pain through peripheral and central adenosine A1 receptors. *Phys Ther*. 2013;93(3):401–12.
12. Sawynok J. Caffeine and pain. *Pain* [Internet]. 2011;152(4):726–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2010.10.011>

13. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J. Effects of caffeine on human health. 2014;(January 2003).
14. Zhu B, Liu K, Cui X, Zhi M, Zhang M, Zhao T, et al. Caffeine Attenuates Electroacupuncture Effect on Pressure Pain Threshold and Tolerance in Healthy Individuals : A Randomized Controlled Trial. 2022;13(July):1–11.
15. Lennard TA, Vivian D, Singla A. Pain Procedures in Clinical Practice. Pain Procedures in Clinical Practice. 2011.
16. Chaudhry H, Schleip R, Ji Z, Bukiet B, Maney M, Findley T. Three-dimensional mathematical model for deformation of human fasciae in manual therapy. J Am Osteopath Assoc. 2008;108(8):379–90.
17. Bialosky JE, Bishop MD, Price DD, Robinson ME, George SZ. The mechanisms of manual therapy in the treatment of musculoskeletal pain: A comprehensive model. Man Ther. 2008 Oct;14(5):531–8.
18. FrançChaudra MED, Sinhorim L, Martins DF, Schleip R, Machado-Pereira NAMM, de Souza GM, et al. Manipulation of the Fascial System Applied During Acute Inflammation of the Connective Tissue of the Thoracolumbar Region Affects Transforming Growth Factor- β 1 and Interleukin-4 Levels: Experimental Study in Mice. Front Physiol. 2020 Dec;11:1517.
19. McKenney K, Elder AS, Elder C, Hutchins A. Myofascial release as a treatment for orthopaedic conditions: A systematic review. J Athl Train. 2013;48(4):522–7.
20. Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. Pain. 2020;161(9):1976–82.
21. Kosek E, Cohen M, Baron R, Gebhart GF, Mico J, Rice ASC, et al. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states ? 2016;157:1382–6.
22. Nijs J, Apeldoorn A, Hallegraeff H, Clark J, Smeets R, Malfliet A, et al. Low back pain: Guidelines for the clinical classification of predominant neuropathic, nociceptive, or central sensitization pain. Pain Physician. 2015;18(3):E333–46.
23. Medzhitov R. Inflammation 2010 : New Adventures of an Old Flame. Cell. 2010;771–6.
24. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature [Internet]. 2008 Jul 24 [cited 2020 Oct 18];454(7203):428–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18650913/>

25. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013;63(1):149–64.
26. Majno G. *The Healing Hand: Man and Wound in the Ancient World*; Cambridge, MA: Harvard Univ Pr; 1975. *Ann Intern Med.* 1998;
27. Majno G. *The healing hand*. Publicações do Commonwealth Fund; 1975. 600 p.
28. Coleman JF. *Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease, 8th Edition*. Vol. 34, *American Journal of Surgical Pathology*. 2010. 132 p.
29. Ospina M, Harstall C. Prevalence of chronic pain : an overview. Alberta: Alberta Heritage Foundation for Medical Research; 2002.
30. Vasconcelos FH, Araújo GC de. Prevalence of chronic pain in Brazil : a descriptive study. *Brazilian J Pain.* 2018;1(2):176–9.
31. SAÚDE DO TRABALHADOR: Dor nas costas foi doença que mais afastou trabalhadores em 2017 — Português (Brasil) [Internet]. Available from: <https://www.gov.br/previdencia/pt-br/assuntos/noticias/previdencia/institucional/saude-do-trabalhador-dor-nas-costas-foi-doenca-que-mais-afastou-trabalhadores-em-2017>
32. Souza C da S, Oliveira AS de. Prevalência de encaminhamentos às doenças musculoesqueléticas segundo a classificação estatística internacional de doenças (CID-10): reflexões para formação do fisioterapeuta na área de musculoesquelética. *Fisioter e Pesqui* [Internet]. 2015;22(1):48–53. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-29502015000100048&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/fp/v22n1/1809-2950-fp-22-01-00048.pdf%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/fp/v22n1/en_1809-2950-fp-22-01-00048.pdf
33. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell.* 2009.
34. *Neurobiology of the emotions.* 2007;35(2):55–65.
35. Esperidião-Antonio V, Majeski-Colombo M, Toledo-Monteverde D, Moreas-Martins G, Fernandes JJ, Assis MB de, et al. *Neurobiology of the emotions.* *Rev Psiquiatria Clínica.* 2008;35(2):55–65.
36. Beecher HK. Pain in Men Wounded in Battle. *Ann Surg.* 1946;123(1):96–105.
37. Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A 2A Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN- γ Production in Murine CD4 + T Cells . *J Immunol.* 2005;

38. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*. 2001.
39. Blackburn MR. Too much of a good thing: Adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;
40. Schulte G, Robertson B, Fredholm BB, Delander GE, Shortland P, Molander C. Distribution of antinociceptive adenosine A1 receptors in the spinal cord dorsal horn, and relationship to primary afferents and neuronal subpopulations. *Neuroscience*. 2003 Nov;121(4):907–16.
41. Herman-de-Sousa C, Pinheiro AR, Paramos-de-Carvalho D, Costa MA, Ferreirinha F, Magalhães-Cardoso T, et al. Opposing Effects of Adenosine and Inosine in Human Subcutaneous Fibroblasts May Be Regulated by Third Party ADA Cell Providers. *Cells* [Internet]. 2020 Mar 7;9(3):651. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/3/651>
42. Lima FO, Souza GR, Verri WA, Parada CA, Ferreira SH, Cunha FQ, et al. Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: Involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway. *Pain*. 2010 Nov;151(2):506–15.
43. Franke H, Verkhratsky A. Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. 2012;(May).
44. Nascimento FP, Macedo-Júnior SJ, Pamplona FA, Luiz-Cerutti M, Córdova MM, Constantino L, et al. Adenosine A1 Receptor-Dependent Antinociception Induced by Inosine in Mice: Pharmacological, Genetic and Biochemical Aspects. *Mol Neurobiol*. 2015;51(3):1368–78.
45. Nascimento FP, Macedo-Júnior SJ, Lapa-Costa FR, Cezar-dos-Santos F, Santos ARS. Inosine as a Tool to Understand and Treat Central Nervous System Disorders: A Neglected Actor? *Front Neurosci* [Internet]. 2021 Aug 24;15. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.703783/full>
46. Macedo-Junior SJ, Nascimento FP, Luiz-Cerutti M, Santos ARS. Role of pertussis toxin-sensitive G-protein, K⁺ channels, and voltage-gated Ca²⁺ channels in the antinociceptive effect of inosine. *Purinergic Signal*. 2013;9(1):51–8.
47. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev*

- Drug Discov. 2006 Mar;5(3):247–64.
48. Reyes CM, Cornelis MC. Caffeine in the Diet : Country-Level Consumption and Guidelines. 2018;
 49. Marchand S, Charest J. Effects of Caffeine on Analgesia from Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation. In 1995. p. 12–4.
 50. Martins DF, Soldi F, Stramosk J, Piovezan AP, Santos ARS. HIGH-INTENSITY SWIMMING EXERCISE REDUCES NEUROPATHIC PAIN IN AN ANIMAL MODEL OF COMPLEX REGIONAL PAIN SYNDROME TYPE I : EVIDENCE FOR A ROLE OF THE ADENOSINERGIC SYSTEM. *Neuroscience* [Internet]. 2013;234:69–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.042>
 51. Ribeiro JA, Sebastião AM, De Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: Pathophysiological implications. *Prog Neurobiol.* 2002;68(6):377–92.
 52. Malek AM, Izumo S. Control of Endothelial Cell Gene Exp. *J Biomech.* 1995;28(12):1515–28.
 53. Lima L, Jesus ID, Lima IA, Ermida IV, Pacheco IA. Mecanotransdução : Importância de Impor Stress na Reparação Tecidual. *Rev da Soc Port Med Física e Reabil.* 2017;29(5):33–9.
 54. Lim CT, Zhou EH, Quek ST. Mechanical models for living cells - A review. *J Biomech.* 2006;39(2):195–216.
 55. Wang -C, Thampatty · B P. An introductory review of cell mechanobiology. *Biomechan Model Mechanobiol.* 2006;5:1–16.
 56. Fang XZ, Zhou T, Xu JQ, Wang YX, Sun MM, He YJ, et al. Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. *Cell Biosci* [Internet]. 2021;11(1):1–20. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00522-z>
 57. Davies PF. Flow-Mediated Endothelial Mechanotransduction. Vol. 75, *REVIEWS.* 1995.
 58. Kjær M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. 2004;649–98.
 59. Carano A, Siciliani G. Effects of continuous and Intermittent forces on human fibroblasts in vitro [Internet]. Vol. 18, *European Journal of Orthodontics.* European Orthodontic Society; 1996. Available from:

- <https://academic.oup.com/ejo/article/18/1/19/476463>
60. Janmey PA, McCulloch CA. Cell mechanics: Integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007;9:1–34.
 61. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure (cell mechanics̄cell engineerinḡtensegritȳextracellular matrix̄mechanotransduction). *Cell Biol.* 1997;94(February 1997):849–54.
 62. Burrell DC, Wood GG. Direct Determinations of Zinc in Seawater by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Anal Chim Acta.* 1969;48:45–9.
 63. Stecco C. *Functional atlas of human fascial system.* Edinburgh: Elsevier; 2015.
 64. Adstrum S, Hedley G, Schleip R, Stecco C, Yucesoy CA. Defining the fascial system. *J Bodyw Mov Ther.* 2017;21:173–7.
 65. Tozzi P. A unifying neuro-fasciogenic model of somatic dysfunction - Underlying mechanisms and treatment - Part II. *J Bodyw Mov Ther.* 2015;19(3):526–43.
 66. Guimberteau, JC. Armstrong C. *Architecture of Human Living Fascia: Cells and Extracellular Matrix as Revealed by Endoscopy (Book & DVD).* Handspring Publishing limited; 2015.
 67. Hinz B. Tissue stiffness, latent TGF- β 1 Activation, and mechanical signal transduction: Implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2009;11(2):120–6.
 68. Langevin HM, Nedergaard M, Howe AK. Cellular control of connective tissue matrix tension. *J Cell Biochem.* 2013;114(8):1714–9.
 69. Schleip R, Klingler W, Lehmann-Horn F. Active fascial contractility: Fascia may be able to contract in a smooth muscle-like manner and thereby influence musculoskeletal dynamics. *Med Hypotheses.* 2005;65(2):273–7.
 70. Jędrzejewski G, Kasper-Jędrzejewska M, Dolibog P, Szyguła R, Schleip R, Halski T. The Rolf Method of Structural Integration on Fascial Tissue Stiffness , Elasticity , and Superficial Blood Perfusion in Healthy Individuals : The Prospective , Interventional Study. *Front Physiol.* 2020;11:1062.
 71. Baur H, Gatterer H, Hotter B, Kopp M. Influence of structural integration and fascial fitness on body image and the perception of back pain. *J Phys Ther Sci.* 2017;29:1010–3.
 72. Stecco C, Gagey O, Belloni A, Pozzuoli A, Porzionato A, Macchi V, et al.

- Anatomy of the deep fascia of the upper limb . Second part : study of innervation. *Morphologie*. 2007;91:38–43.
73. Sinhorim L, Amorim MDS, Ortiz ME, Bittencourt EB, Bianco G, da Silva FC, et al. Potential nociceptive role of the thoracolumbar fascia: A scope review involving in vivo and ex vivo studies. *J Clin Med*. 2021;10(19).
 74. Stecco C, Gagey O, Belloni A, Pozzuoli A, Porzionato A, Macchi V, et al. Anatomy of the deep fascia of the upper limb. Second part: study of innervation. *Morphologie*. 2007;
 75. Sinhorim L, Amorim M, Jaques Torres L, Wagner J, Tiepo Niza N, De Paula Lemos F, et al. CASE REPORT Acute effect of myofascial reorganization of the trapezius muscle in peripheral muscle oxygenation in asymptomatic subjects-a case series. *Man Ther Posturology Rehabil J*. 2019;1–7.
 76. Grant G, Willard F, Elisa M, França D, Sinhorim L, Martins DF, et al. Manipulation of the Fascial System Applied During Acute Inflammation of the Connective Tissue of the Thoracolumbar Region Affects Transforming Growth Factor- β 1 and Interleukin-4 Levels : Experimental Study in Mice. 2020;11(December):1–12.
 77. Barnes MF. The basic science of myofascial release: morphologic change in connective tissue. *J Bodyw Mov Ther*. 1997 Jul;1(4):231–8.
 78. Ajimsha MS, Binsu D, Chithra S. Effectiveness of myofascial release in the management of plantar heel pain: A randomized controlled trial. *Foot*. 2014;24(2):66–71.
 79. Jędrzejewski G, Kasper-Jędrzejewska M, Dolibog P, Szyguła R, Schleip R, Halski T. The Rolf Method of Structural Integration on Fascial Tissue Stiffness, Elasticity, and Superficial Blood Perfusion in Healthy Individuals: The Prospective, Interventional Study. *Front Physiol*. 2020;11.
 80. Sinhorim L, Amorim M, Torres LJ, Wagner J, Niza NT. Acute effect of myofascial reorganization of the trapezius muscle in peripheral muscle oxygenation in asymptomatic subjects – a case series . 2019;(April):1–7.
 81. Wayne WD, Chad LC. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 10th ed. Wiley, editor. Applied Statistics. 2013. 960 p.
 82. Martins DF, Brito N, Stramosk J, Batisti AP, Madeira F, Turnes BL, et al. Peripheral Neurobiologic Mechanisms of Antiallodynic Effect of Warm Water Immersion Therapy on Persistent Inflammatory Pain. 2015;166(June

- 2014):157–66.
83. Brack A, Rittner HL, Machelska H, Leder K, Mousa SA, Stein C, et al. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. 2004;112:229–38.
 84. Loram LC, Harrison JA, Sloane EM, Hutchinson MR, Sholar P, Taylor FR, et al. Enduring reversal of neuropathic pain by a single intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists: A novel therapy for neuropathic pain. *J Neurosci*. 2009 Nov;29(44):14015–25.
 85. Martins DF, Bobinski F, Mazzardo-Martins L, Cidral-Filho FJ, Nascimento FP, Gadotti VM, et al. Ankle Joint Mobilization Decreases Hypersensitivity by Activation of Peripheral Opioid Receptors in a Mouse Model of Postoperative Pain. *Pain Med (United States)*. 2012;13(8):1049–58.

ANEXO A – Parecer de Aprovação da CEUA



Pró Reitoria Acadêmica - PROAC
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 25 de agosto de 2021
Registro na CEUA Nº 21.021.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do papel do receptor adenosinérgico na analgesia induzida pela Reorganização miofascial em camundongos com inflamação na pata", registrada com o nº 21.021.4.01.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 13 de setembro de 2021.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão