



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
LISANDRO ANTONIO CECI

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES FPR2/ALX PERIFÉRICOS
E ESPINAIS NO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA MOBILIZAÇÃO ARTICULAR
EM UM MODELO ANIMAL DE DOR PÓS-OPERATÓRIA**

LISANDRO ANTONIO CECI

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES FPR2/ALX PERIFÉRICOS
E ESPINAIS NO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA MOBILIZAÇÃO ARTICULAR
EM UM MODELO ANIMAL DE DOR PÓS-OPERATÓRIA**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para a obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. DANIEL FERNANDES MARTINS, Dr.

Palhoça
2018

C38 Ceci, Lisandro Antonio, 1980-

Avaliação da participação dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais no efeito anti-inflamatório da mobilização articular em um modelo animal de dor pós-operatória / Lisandro Antonio Ceci. – 2018. 70 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof. Daniel Fernandes Martins

1. Dor pós-operatória - Tratamento. 2. Dor – Tratamento. 3. Inflamação - Tratamento. I. Martins, Daniel Fernandes, 1982-. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.0472

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Avaliação da participação dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais no efeito anti-inflamatório da mobilização articular em um modelo animal de dor pós-operatória

LISANDRO ANTONIO CECI
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 27 de julho de 2018.

Doutor Daniel Fernandes Martins (orientador)

Doutor Afonso Shiguemi Inoue Salgado (Avaliador externo - Instituto Salgado) - *Presente por Videoconferência*

Doutora Franciane Bobinski (avaliador interno - PPGCS)

Professor Doutor Jefferson Traibert

COORDENADOR 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 – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621.3100
- * Campus Universitário de Tubarão – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621.3000
- * Campus Universitário da Grande Florianópolis – Av. Pedra Branca, 25 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-270 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279.1000
- * Campus Universitário UnisulVirtual – Av. dos Lagos, 41 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-100 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279.1242

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

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

Muitas pessoas direta ou indiretamente fizeram parte desta minha jornada no mestrado, e a cada uma delas fica meu agradecimento, porém algumas delas, acredito que devem ser mencionadas de forma especial.

Aos professores do PPGCS, obrigado pelo conhecimento transmitido.

Às secretárias do PPGCS Marieli e Caroline, que sempre estiveram à disposição e prontamente sanavam minhas dúvidas.

Aos colegas da turma 2016-2, que estavam sempre dispostos a me auxiliar.

Aos amigos que fiz no LANEX, obrigado pelos ensinamentos sobre as rotinas, testes, procedimentos, mas principalmente pela ajuda e compreensão nas minhas dificuldades. Aqui deixo um agradecimento especial aos que estiveram envolvidos nos experimentos, Dai, Dani, Leidi, Julia, Gustavo, Kamilla, sem a ajuda de vocês os experimentos não teriam acontecido.

Aos amigos da UNISUL, Cintia, Rômulo, Ralph, Luiz, Anna, obrigado pelo incentivo e apoio.

Aos amigos e colegas de trabalho de Londrina, que foram sempre muito compreensivos com minhas ausências. Aos diretores do Instituto, obrigado pelo pontapé inicial e suporte durante o mestrado.

Ao amigo, professor orientador Dr. Daniel Fernandes Martins, que me incentiva com os questionamentos, ensina com as correções, mas também sempre foi compreensivo e paciente nas minhas dificuldades. Com certeza sua forma de orientação me ensinou mais do que pode ter imaginado.

À minha esposa Luciene, que nestes 2 anos de muitas mudanças na nossa vida pessoal, esteve ao meu lado incondicionalmente para comemorar, ajudar, consolar e me estimular quando tive vontade de desistir, literalmente esteve junto a mim na alegria e na tristeza. Te amo.

À minha filha Mariana, que mesmo sem compreender o motivo das minhas ausências, fez parte desta etapa da minha vida de forma intensa. Obrigado filha por ser, junto com a mamãe, o motivo de me fazer sorrir quando as dificuldades apareceram. Te amo “cheirinho”.

A DEUS, que me deu forças e colocou todas estas pessoas citadas ao meu redor. A Ti toda a honra e glória.

“Pode o homem tornar-se culto pela cultura dos outros, mas só se torna sábio pelas próprias experiências.” (Mansour Chalita).

RESUMO

Introdução: Muitos pacientes desenvolvem dor crônica após procedimentos cirúrgicos, mas os mecanismos subjacentes à transição de estados de dor aguda para dor crônica não são totalmente compreendidos. Atualmente está estabelecido que a inflamação aguda está acompanhada de um programa ativo de resolução com a síntese de mediadores pró-resolutivos especializados. A terapia manual (TM) vem crescendo em abordagens de manejo da dor, onde técnicas vem sendo cada vez melhor descritas e seus efeitos explicados cientificamente.

Objetivo: Avaliar o envolvimento dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais no efeito anti-hiperalgésico da mobilização articular do tornozelo (MAT) em camundongos com dor pós-operatória.

Métodos: Foi realizada uma cirurgia de incisão plantar (CIP) em camundongos Swiss machos (25-35g) e avaliada a hiperalgesia mecânica pelo teste de von Frey, o edema, através de um micrometro, e a temperatura da pata através de termografia. Os animais foram tratados com duas velocidades de MAT ou BML-111 (agonista do receptor FPR2/ALX) por 5 dias consecutivos. Outros grupos de animais receberam, veículo ou WRW4 (antagonista do receptor FPR2/ALX) na pata ou medula espinal e foram tratados com placebo MAT ou MAT por três dias consecutivos.

Resultados: O tratamento com BML-111 e com MAT Lenta (MATL), mas não MAT Rápida, reduziram a hiperalgesia mecânica. O tratamento com BML-111 e MATL não modificaram o edema. A MATL promoveu aumento da temperatura após o tratamento 24h após a CIP e assim como o BML-111 reduziram a temperatura após os tratamentos 48h após CIP e 72h pós CIP somente o BML-111 reduziu a temperatura. O pré-tratamento intraplantar (i.pl) e intratecal (i.t) com WRW4 preveniu o efeito anti-hiperalgésico tanto do BML-111 quanto da MAT.

Conclusão: O modo de aplicação da MAT no modelo de dor pós-operatória é crucial na obtenção dos resultados sobre a hiperalgesia mecânica sendo que a MATL, mas não a MAT rápida, produz estes resultados, sendo o efeito mediado, pelo menos em parte, pelo receptor FPR2/ALX tanto periférico quanto espinal.

Descritores: *Dor pós-operatória. Inflamação. Terapia manual. Mediadores pró-resolutivos*

ABSTRACT

Introduction: Several patients develop chronic pain after surgical procedures, but the underlying mechanisms of transition from acute to chronic states aren't totally understood. Nowadays it's well established that acute inflammation is accompanied of an active resolution program with specialized pro-resolving mediators. Manual therapy is evolving in pain management approaches and techniques are being better described and its effects scientifically explained.

Objective: evaluate the involvement of peripheral and spinal FPR2/ALX receptors on anti-hyperalgesic effect of ankle joint mobilization (AJM) in postoperative pain induced mice.

Methods: A plantar incision (PI) was performed in male Swiss mice (25-35g) and evaluated the mechanical hyperalgesia through von Frey test, paw edema with a micrometer and paw temperature through thermograph. Animals were treated with 2 AJM velocities or BML-111 (a FPR2/ALX receptor agonist) for 5 consecutive days. Other animal groups received vehicle or WRW4 (a FPR2/ALX receptor antagonist) at paw and treated with placebo AJM or AJM for 3 consecutive days.

Results: BML-111 and slow AJM (sAJM) treatment, but not rapid AJM (rAJM), reduced mechanical hyperalgesia. BML-111 and sAJM treatments did not modify paw edema. sAJM increased paw temperature after treatment 24h after PI and as well as BML-111 reduced paw temperature after treatment 48h after PI, and, 72h after PI, only BML-111 reduced temperature. WRW4 i.pl and i.t pre-treatment prevented the anti-hyperalgesic effect of both BML-111 and AJM.

Conclusion: AJM application mode in a postoperative model is crucial to obtain results in mechanical hyperalgesia were sAJM, but not rAJM produces those results, being mediated, at least in part, by peripheral and spinal FPR2/ALX receptor.

Key words: postoperative pain. Inflammation. Manual therapy, Pro-resolving mediators.

LISTAS

Lista de abreviaturas

AA – Ácido araquidônico

ADM – Amplitude de movimento

ANOVA – Análise de variância (do inglês, *Analysis of variance*)

AnxA1 – Anexina-A1 (do inglês, *Annexin A1*)

BML-111 – Metil-éster-ácido-triidroxiheptaenóico (do inglês, *Trihydroxyheptanoic acid methyl ester*)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA – Adjuvante completo de Freund (do inglês, *complete Freund's adjuvant*)

CFMV – Conselho federal de medicina veterinária

CIP – cirurgia de incisão plantar

CRH – Hormônio liberador de corticotropina (do inglês, *corticotrophin release hormone*)

CXCL-1 – ligante da quimiocina CXC

CXCR-1 – receptor para o ligante da quimiocina CXC

DPCPX – 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina.

DPM – Desvio padrão da média

EMG – Eletromiografia

FPR – receptor para peptídeos formilados (do inglês, *Formyl peptide receptor*)

FPR2/ALX – Receptor para lipoxina

GFAP – proteína glial fibrilar ácida (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*)

HPA – hipotalâmico-pituitária-adrenal

IL – Interleucina (do inglês, *Interleukin*)

i.pl. – intraplantar

i.t. – intratecal

LaNEEx – Laboratório de Neurociências Experimental

LC – *locus ceruleus*

LOX - lipoxigenase

LTA₄ – Leucotrieno A₄

LXs – Lipoxinas (do inglês, *Lipoxins*)

LXA₄ – Lipoxina A₄ (do inglês, *Lipoxins A₄*)

LXB₄ – Lipoxina B₄ (do inglês, *Lipoxins B₄*)

MA – Mobilização articular

MAT – Mobilização articular do tornozelo

MIA – Morte Indolor Assistida

MATL – Mobilização articular do tornozelo lenta

MATR – Mobilização articular do tornozelo rápida

NCeA – Núcleo central da amígdala

O₂ – Oxigênio

Rv - resolvina

s.c. – Subcutâneo

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

TM – Terapia manual

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa (do inglês, *tumor necrosis factor-alpha*)

TGF- β – Fator de transformação de crescimento-beta (do inglês, *transforming growth factor-beta*)

UFSC – Univeridade Federal de Santa Catarina

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

vF – von Frey

WRW4 – (Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-CONH₂ - um antagonista seletivo para o FPR2)

15-HPETE – Ácido 15-Hydroxyeicosatetraenoico (do inglês, *15-Hydroxyeicosatetraenoic acid*)

5-LOX – 5-lipoxigenase (do inglês, *5-Lipoxygenase*)

12-LOX – 12-lipoxigenase (do inglês, *12-Lipoxygenase*)

15-LOX – 15-lipoxigenase (do inglês, *15-Lipoxygenase*)

Lista de figuras

Figura 1 – Vias de síntese das lipoxinas	10
Figura 2 – Representação esquemática da resolução da inflamação	11
Figura 3 – Aplicação da técnica de MA grau III em humanos.....	15
Figura 4 – Delineamento cronológico do estudo	20
Figura 5 – Delineamento da avaliação da participação do receptor FPR2/ALX no efeito da MAT	21
Figura 6 – Etapas de execução do procedimento de indução do modelo de dor pós-operatória através da incisão plantar	22
Figura 7 – Tratamento com a MA	23
Figura 8 – Avaliação da hiperalgesia mecânica através do filamento de von Frey	23
Figura 9 – Avaliação do edema da pata	24
Figura 10 – Avaliação da temperatura da pata	25
Figura 11 – Efeitos do tratamento com BML-111 na hiperalgesia mecânica	29
Figura 12 – Efeito do tratamento com MAT em duas velocidades na hiperalgesia mecânica	30
Figura 13 – Efeito do tratamento com MAT e com BML-111 no edema da pata	31
Figura 14 – Efeito do tratamento com MAT e com BML-111 na temperatura da pata	33
Figura 15 – Avaliação do envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico do BML-111 no primeiro dia após a CIP	34
Figura 16 – Avaliação do envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico do BML-111 no terceiro dia após a CIP	35
Figura 17 – Avaliação do envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico da MAT no primeiro e terceiro dia após a CIP	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
1.1.1 Dor pós-operatória	7
1.1.2 Resolução da inflamação	8
1.1.3 Terapia manual	12
1.1.3.1 Mobilização articular.....	14
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. MÉTODOS	19
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	19
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	19
3.3 ANIMAIS.....	19
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	20
3.5 TESTES.....	21
3.5.1 Modelo animal de dor pós-operatória	21
3.5.2 Técnica de MA em camundongos	22
3.5.3 Testes comportamentais	23
3.5.3.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica	23
3.5.3.2 Avaliação do edema da pata	24
3.5.3.3 Avaliação da temperatura da pata	24
3.5.3.4 Investigação do envolvimento dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais no efeito anti-inflamatório do BML-111 e da MAT no modelo animal de dor pós-operatória.....	25
3.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	26
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	26
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM BML-111 NA HIPERALGESIA MECÂNICA	28
4.2 COMPARAÇÃO DO EFEITO DE DUAS VELOCIDADES DA MAT NA HIPERALGESIA MECÂNICA	29

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATL E DO BML-111 NO EDEMA DA PATA.....	31
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATL E DO BML-111 NA TEMPERATURA DA PATA	32
4.5 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO E ESPINAL NO EFEITO ANTIHIPERALGÉSICO DO BML-111.....	33
4.6 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO E ESPINAL NO EFEITO ANTIHIPERALGÉSICO DA MATL.....	35
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	46
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO A- Parecer Aprovação Comissão de Ética.....	61

1. INTRODUÇÃO

Um número alarmante de pacientes desenvolve dor persistente ou crônica após procedimentos cirúrgicos, mas os mecanismos subjacentes à transição de estados agudos para dor crônica não são totalmente compreendidos¹. A dor pós-operatória apresenta um componente inflamatório inicial que pode contribuir para esta transição^{1,2}. Além disso, uma causa comum de dor inflamatória é a dor pós-operatória^{3,4}. A dor pós operatória apresenta característica previsível, porém seu mal gerenciamento pode ter implicações profundas que podem levar a alterações clínicas e psicológicas que aumentam a morbidade e mortalidade, bem como os custos de tratamento⁵, sendo que a sua incidência está em torno de 20 a 50%⁶.

A inflamação desregulada é um processo patológico central em diversos estados patológicos de dor. Tradicionalmente, abordagens terapêuticas têm procurado modular os processos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, com razoável sucesso. No entanto, com o aumento do conhecimento sobre as vias pelas quais a inflamação é resolvida abre novas oportunidades para manipular esses processos - uma estratégia que pode representar uma abordagem terapêutica complementar, e talvez até mesmo superior as intervenções atuais⁷.

Atualmente está bem estabelecido que a inflamação aguda está acompanhada de um programa ativo de resolução que inicia nas primeiras horas após a instalação da inflamação e envolve a síntese de mediadores pró-resolutivos especializados derivados de ácidos graxos poli-insaturados como o ômega-3 e 6, incluindo as lipoxinas (LXA₄), resolvinas, protetinas e maresinas^{8,9}, bem como mediadores proteicos como a proteína induzida por glicocorticoide – anexina A1 (AnxA1).

Alguns destes mediadores proteicos (AnxA1)¹⁰ e lipídicos (LXA₄ e Resolvina D1)^{10,11} apesar de apresentarem diferentes naturezas, desempenham um importante papel na modulação da dor inflamatória por meio da ativação do receptor para peptídeos formilados FPR2/ALX (do inglês, *formyl peptide receptor*). O receptor FPR2/ALX, por seus efeitos benéficos na resolução da inflamação, tem sido o foco de rastreamento intenso para a descoberta de novas terapêuticas anti-inflamatórias e pró-resolutivas.

Dentre os efeitos da ativação do receptor FPR2/ALX, destaca-se a redução do recrutamento dos neutrófilos e a facilitação da resolução da inflamação por estimular

monócitos e macrófagos a realizarem a fagocitose sem liberarem citocinas ou quimiocinas¹².

Enquanto há um interesse considerável no desenvolvimento clínico de agentes farmacológicos e abordagens nutricionais que podem promover a resolução da inflamação por meio destes mediadores e vias¹³⁻¹⁵, também é importante entender os mecanismos não farmacológicos e que também podem promover a resolução da inflamação, tendo como um exemplo a fisioterapia e em particular a mobilização articular (MA).

Várias modalidades dentro das áreas médicas têm sido estudadas para melhorar o gerenciamento da dor pós-operatória e, dentro da fisioterapia não é diferente. Estas terapias incluem desde mobilizações articulares^{16,17}, reabilitação sensório-motora¹⁸ e também terapias integrativas e complementares^{19,20}. A terapia manual (TM) vem crescendo em abordagens para o manejo da dor, onde técnicas vem sendo cada vez melhor descritas e seus efeitos explicados cientificamente, como por exemplo a técnica de MA^{17,21}.

A exemplo disso, Martins e colaboradores¹⁷ mostraram que a mobilização articular do tornozelo (MAT) por 9 minutos reduz a hiperalgesia mecânica causada por incisão plantar em camundongos e que este efeito parecer ser mediado, pelo menos em parte pela ativação de receptores opioides¹⁷, canabinoides²², adenosinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos²¹.

Recentemente, tem sido demonstrado que o alongamento de tecidos conjuntivos (uma técnica de TM) impacta diretamente na resolução da inflamação. Os autores observaram que o alongamento reduziu a lesão inflamatória e o número de neutrófilos infiltrados, e que este efeito foi mediado pelo aumento das concentrações de resolvinas D1 no sítio da lesão²³.

Com base no exposto acima, se postulou a seguinte pergunta: pode a MAT causar efeito anti-inflamatório por meio da ativação do receptor FPR2/ALX?

Assim, o presente estudo investigou por meio de testes comportamentais e farmacológicos o efeito anti-inflamatório da MAT e o envolvimento dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais neste efeito.

Compreender os mecanismos de ação neurofisiológicos e bioquímicos das técnicas de TM promoverá mais segurança na utilização e também abre possibilidades para que adaptações e modificações sejam feitas permitindo que novas técnicas sejam desenvolvidas afim de minimizar as condições dolorosas.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Dor pós-operatória

Mais de 240 milhões de cirurgias são realizadas mundialmente todos os anos constituindo aproximadamente 38% de todos os procedimentos ortopédicos, sendo considerado um dos procedimentos mais dolorosos no período pós-operatório²⁴.

A dor pós-operatória ainda é insuficientemente tratada, com mais de 50% dos pacientes experimentando níveis inaceitáveis de dor logo após a cirurgia²⁵. Mesmo com um protocolo de controle da dor aguda em procedimentos cirúrgicos. Sommer *et al.*²⁶, mostraram que 41% dos pacientes apresentaram dor moderada a severa no dia da cirurgia, com quase 15% dos pacientes sofrendo de dor moderada a grave no quarto dia pós-operatório.

Sem o controle da dor adequado, podem haver efeitos adversos no resultado do procedimento cirúrgico incluindo limitação da amplitude de movimento (ADM), diminuição de força e perda funcional²⁷. Com isso há uma ênfase crescente em prover analgesia pós operatória para melhora destes parâmetros mencionados²⁸.

Estudos sugerem que os mecanismos de dor pós-operatória são diferentes dos estados de dor inflamatória e neuropática. Tem sido demonstrado que há uma hiperalgesia na região da incisão, sendo ela mediada pela sensibilização de fibras aferentes primárias do tipo A δ e do tipo C e pela ativação de nociceptores silenciosos após a incisão^{3,26,29}.

Para compreender os mecanismos da dor causada por incisões, um estudo mostrou que quando realizada uma pequena incisão no antebraço de voluntários saudáveis, foi observado que a dor ao repouso desapareceu 2 horas após a incisão, porém, a resposta a estímulos mecânicos continuou presente por 7 dias³⁰.

Os agentes terapêuticos utilizados atualmente para tratamento da dor geralmente tem sua eficácia e segurança limitados³¹. O uso de anti-inflamatórios pode induzir vários efeitos colaterais tais como lesões gastrointestinais ou falência renal ou hepática³². Além disso o uso dos agentes analgésicos como os opioides, é frequentemente dificultado por efeitos colaterais relacionados à dose tais como, tolerância e dependência³³.

A dor incisional é um dos modelos mais comuns de dor aguda em animais e mais especificamente sendo amplamente utilizado por ser reprodutível, quantificável e principalmente por mimetizar uma condição clínica^{29,34}. Este modelo tem sido desenvolvido inicialmente em ratos por Brennan *et al.*³⁵ onde observaram a indução de hiperalgisia mecânica e térmica no quadro pós-operatório. Essas respostas são similares às encontradas em outros modelos animais, por exemplo com a sensibilização dos neurônios aferentes primários (nociceptores polimodais) na pata de coelhos³⁶ e, em relação à atividade de fibras do tipo C nociceptivas no braço (pele com pelos) de macacos³⁷, indicando nestes casos hiperalgisia primária.

Posteriormente, Pogatzki e Raja²⁹ adaptaram este modelo em camundongos com modificações em relação ao modelo em ratos principalmente quanto ao tamanho da incisão e ao número de pontos para fechamento da incisão. As respostas de hiperalgisia mecânica e térmica foram similares ao modelo em ratos.

Como este modelo de dor pós-operatória foi bem estabelecido quanto às respostas de hiperalgisia, a compreensão dos mecanismos destas respostas começou então a ser estudado. Análise de áreas cerebrais envolvidas na hiperalgisia³⁸, envolvimento do sistema opioide¹⁷, do sistema adenosinérgico²¹ e canabinoidérgico²².

Este modelo também é utilizado para a verificação do efeito de diferentes abordagens terapêuticas como a farmacologia, a naturologia¹⁹, a eletroacupuntura³⁹ e a fisioterapia^{17,40}

1.1.2 Resolução da inflamação

A inflamação é uma reação protetora, iniciada após uma infecção e/ou lesão. As respostas inflamatórias visam eliminar o estímulo incitante, promover cicatrização e reparo tecidual⁴¹. Também é considerada um mecanismo de resposta tecidual dinâmica que foi desenvolvido através da evolução para defender o corpo da invasão de patógenos, é um processo ativo, coordenado e focado na restauração da função e integridade tecidual^{42,43}.

A ideia que o processo de resolução causa, não somente a terminação da inflamação, mas assiste a mudança da imunidade inata para adaptativa, provê oportunidades adicionais para atuação em patologias que envolvem inflamação ou inflamação crônica^{41,44}. Geralmente, terapias anti-inflamatórias convencionais são

baseadas na inibição de fatores que impulsionam a inflamação. Informações sobre a biologia da resolução deram a possibilidade de: atrelar fatores que catabolizam sinalização pró-inflamatória; inibir vias que degradam mediadores pró-resolutivos; ou ativar seletivamente e potentemente os receptores nos quais os mediadores pró-resolutivos atuam⁴¹.

Para prevenir a progressão da inflamação aguda-resolutiva para crônica-persistente, a reação inflamatória deve ser ativamente resolvida, inibindo lesões teciduais adicionais. A resolução ocorre em fases sobrepostas orientadas pela produção de mediadores pró-resolutivos com características de limitação da infiltração de neutrófilos, regulação de citocinas e quimiocinas, apoptose de neutrófilos e sua subsequente eferocitose por macrófagos, mudança do fenótipo dos macrófagos de classicamente ativados para alternativamente ativados e, o retorno das células para a vascularização ou linfa, e com isso a iniciação do processo cicatricial levando à homeostase tecidual⁴³. Dentro deste processo, os macrófagos possuem uma plasticidade que se torna aparente durante a fase de resolução da inflamação. Após a apoptose das células, os macrófagos desligam-se da produção de mediadores pró-inflamatórios como o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 1 beta (IL-1 β) e a interleucina 6 (IL-6), e começam a liberar substâncias anti-inflamatórias como a liberação de interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)^{42,43}. A interação inter-celular em um foco inflamatório pode promover a biossíntese transcelular de um grupo especializado de mediadores lipídicos incluindo as lipoxinas⁴⁵.

As lipoxinas foram os primeiros mediadores reconhecidos com atividades tanto anti-inflamatórias quanto pró-resolutiva, sendo biossintetizadas pela ação sequencial das lipoxigenases e de outras enzimas^{46,47}. Dadas as ações das lipoxinas em inibir a adesão e o extravasamento de leucócitos elas eram inicialmente consideradas como um sinal de interrupção da cascata inflamatória^{45,47}. Entretanto, suas distintas funções em promover a eferocitose de neutrófilos e a reprogramação de macrófagos demonstraram o papel das lipoxinas endógenas (LXA₄ e LXB₄) em promover a resolução da inflamação⁴⁵. Derivadas do ácido araquidônico e tendo sua síntese pela ação sequencial da lipoxigenase (LOX), nas células epiteliais, as lipoxinas são geradas nos neutrófilos pela ação da enzima 15-lipoxigenase (15-LOX) que então produz o ácido 15-hidroxi-eicosatetranóico (15-HPETE) que então é convertido pela 5-lipoxigenase (5-LOX) em LXA₄. Já a biossíntese nos vasos sanguíneos envolve a

ação da 5-LOX liberando o intermediário leucotrieno A4 (LTA₄) que então é convertido nas plaquetas pela 12-lipoxigenase (12-LOX) em LXA₄ e LXB₄) conforme visto na figura 1^{48,49}.

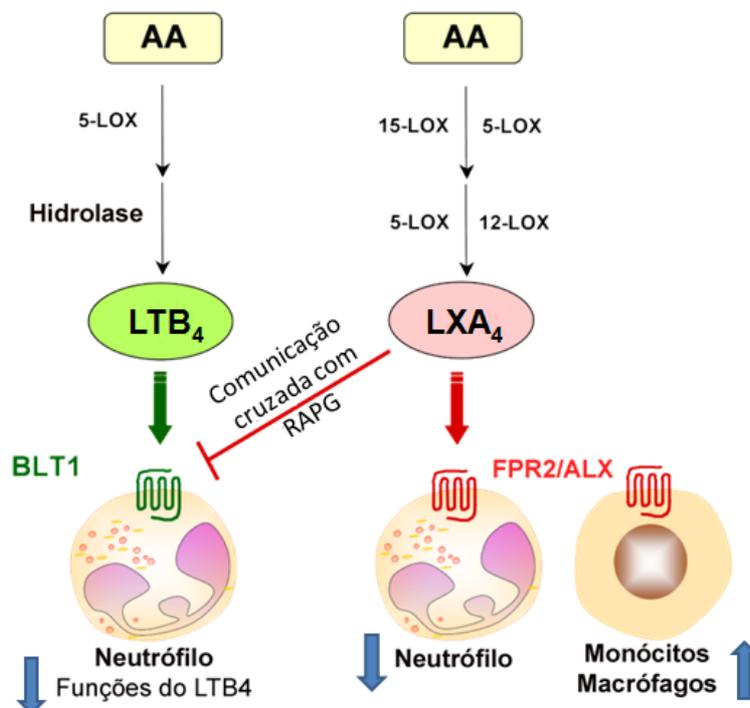


Figura 1 – Vias de síntese das lipoxinas e ação sobre as células na inflamação.

Legenda: Duas formas clássicas de síntese de lipoxinas (LXA₄) através da lipoxigenase. A ação geral da LXA₄ é atribuída à suas interações com os receptores acoplados à proteína G (RAPG) onde existe ativação direta pelo seu receptor denominado ALX que tem sinalização celular para reduzir a infiltração de neutrófilos e estimular os monócitos e macrófagos. Há também a via indireta com comunicação cruzada com outros RAPG como o receptor do leucotrieno B₄(LTB₄) chamado BLT1. AA: ácido araquidônico; 5-LOX: 5-lipoxigenase; 12-LOX: 12-lipoxigenase; 15-LOX: 15-lipoxigenase

Fonte: Adaptado de Serhan et al⁵⁰

Os efeitos da LXA₄ são mediados pelos receptores acoplados à proteína G pertencente à classe dos receptores FPR, se ligando com grande afinidade ao receptor FPR2/ALX. Este tem sua expressão induzida tanto por mediadores pró-inflamatórios (TNF- α) quanto anti-inflamatórios e glicocorticóides em diferentes células, principalmente às do sistema imunológico como os neutrófilos, macrófagos e micróglia⁵¹⁻⁵³.

Como verificado na figura 2, na inflamação, a ativação do receptor FPR2/ALX pela LXA₄ em neutrófilos e em células endoteliais diminui a expressão das moléculas de adesão celular impedindo a migração para o tecido, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6. Já nos macrófagos as LXA₄ contribuem para a eferocitose de neutrófilos apoptóticos^{48,49}.

A (AnxA1), que também é um ligante do FPR2/ALX, é uma proteína da família das anexinas e são expressas em grande quantidade nos neutrófilos, monócitos e macrófagos e o grande efeito no processo inflamatório se deve pela inibição do extravasamento de leucócitos para o local da inflamação pela inibição da atividade das moléculas de adesão (integrinas e selectinas) nas interações leucócito-endotélio⁵⁴⁻⁵⁶.

Todas estas substâncias atuam localmente ou também a distância do seu local de produção e uma fase aguda sistêmica acompanha a inflamação local. Isto é seguido de uma resposta anti-inflamatória compensatória para atenuar o estado pró-inflamatório, e é este equilíbrio entre a resposta pró e anti-inflamatória que determina a resolução da resposta inflamatória⁵⁷

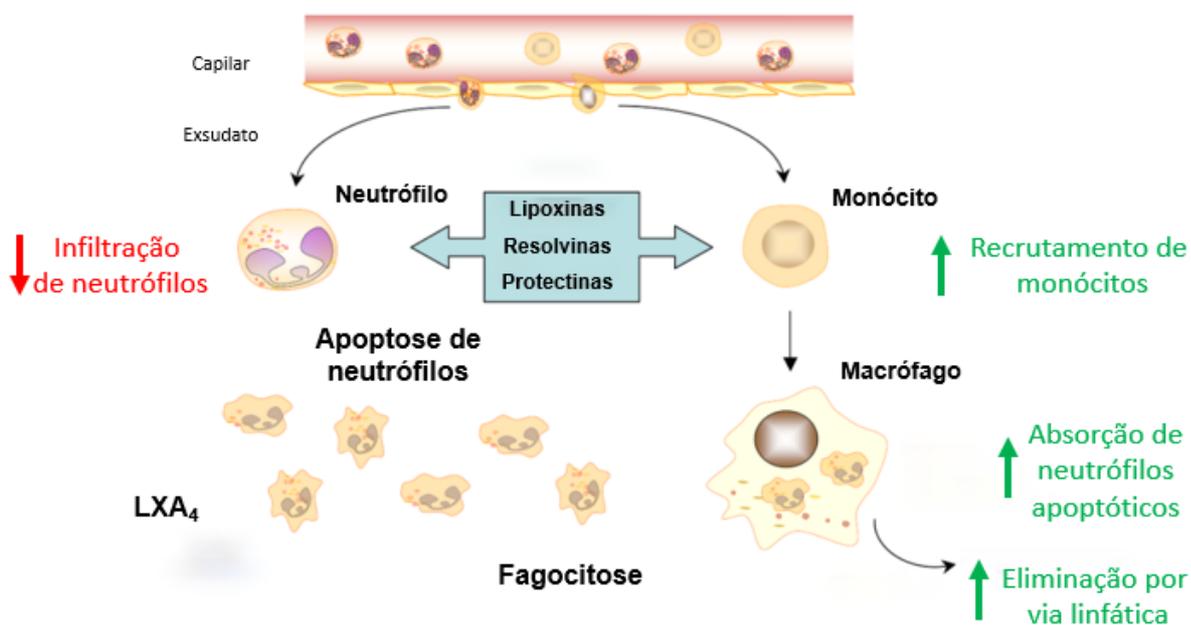


Figura 2 – Papel dual anti-inflamatório e pró-resolutivo das lipoxinas, resolvinas e protectinas

Legenda: a característica histológica chave na resolução é a redução de neutrófilos do sitio da inflamação. Este é um processo programado que é ativamente regulado em múltiplos níveis: pela redução da infiltração de neutrófilos no exsudato, aumento

do recrutamento de monócitos, estimulação da absorção pelos macrófagos de neutrófilos apoptóticos e promoção da remoção via linfa do produto fagocitado.

Fonte: Adaptado de Serhan et al⁵⁰

A análise destes marcadores pró-inflamatórios no processo de resolução da inflamação e seu comportamento em relação ao tempo tem sido estudados em algumas condições patológicas e de tratamento como por exemplo na análise das citocinas em trauma cirúrgico⁵⁷, no efeito do laser em cicatrização de feridas⁵⁸ e com o alongamento na inflamação aguda²³. Entretanto devemos investigar estas análises para melhor entender os mecanismos e processos implícitos em cada patologia ou tratamento.

1.1.3 Terapia manual

Técnicas de tratamento manual utilizadas atualmente pela fisioterapia possuem um histórico que toma parte no desenvolvimento da medicina moderna. Hipócrates, Galeno e Avicenna relatavam a abordagem de disfunções musculo-esqueléticas através de técnicas manuais. Mas foi no século XIX com o desenvolvimento da osteopatia e de outros métodos manuais que esta modalidade ganhou abordagens mais específicas e estudos clínicos começaram a ser realizados^{59,60}.

Desde o início, muitas variações de técnicas de TM tem sido desenvolvida e comercializada. A cada ano, até 8,1 bilhões de dólares são gastos nos Estados Unidos em serviços com terapias manuais, incluindo manipulações quiropáticas/osteopáticas e massagens.

Evidências sugerem que a TM possui tratamentos eficazes em patologias músculo-esqueléticas como a fascíte plantar^{61,62}, tendinopatias de cotovelo⁶³ e dor lombar^{64,65}, no controle postural⁶⁶, no equilíbrio dinâmico⁶⁷ e outras patologias como as obstruções intestinais⁶⁸ e a enxaqueca⁶⁹.

Apesar das evidências disponíveis e dos enormes gastos anuais com essas terapias, seu mecanismo neurobiológico ainda não foi completamente elucidado^{16,21,70}. Em várias condições patológicas, os efeitos clínicos dessas técnicas se mostram eficazes sejam isoladamente ou concomitantes ao uso de outras modalidades de tratamento dentro do escopo do tratamento fisioterapêutico^{62,71}.

O conhecimento do mecanismo neurobiológico dessas técnicas torna-se importante para que as abordagens terapêuticas sejam melhor direcionadas para o tratamento das patologias dos indivíduos, afim de alcançar um número maior de indivíduos respondedores a essas técnicas ou métodos, além da melhor aceitação pelos próprios profissionais da saúde⁷²

Os efeitos da TM têm sido estudados por mecanismos biomecânicos e/ou neurofisiológicos. Dados prévios demonstram resultados por meio de mecanismo biomecânico^{73,74}, porém os resultados podem ser tendenciosos e a relação com os resultados clínicos pode ser questionável,^{73,75} onde verifica-se que somente ocorrem efeitos transitórios quando quantificado o movimento⁷³⁻⁷⁶ e que não ocorre uma modificação duradoura de efeitos posicionais^{77,78}.

A baixa confiabilidade na avaliação de disfunções biomecânicas^{79,80} sugerem a incapacidade do terapeuta de identificar uma área que necessita de tratamento com técnicas de TM e também dados que mostram efeitos à distância do local tratado. Por exemplo a melhora de parâmetros da coluna cervical quando aplicado a TM na coluna torácica^{81,82}, o tratamento na coluna cervical para melhora do quadro de epicondilite lateral⁸³ e a manipulação pélvica em indivíduos com síndrome patelo-femoral⁸⁴.

Estudos em humanos envolvendo a elucidação do mecanismo neurofisiológico também apresentam suas limitações pois geralmente o mecanismo não é realmente testado por questões de ética em pesquisa mas sim hipotetizam os mecanismos por uma análise dos efeitos que podem ser mensurados, como por exemplo, a redução da atividade eletromiográfica (EMG)⁸⁵ e redução da inibição muscular^{86,87} por meio da TM, estarem associados à estimulação de mecanorreceptores ou proprioceptores que produzem um efeito mediado pela medula espinal^{86,87}.

A análise da possível combinação dos efeitos biomecânicos e neurofisiológicos é frequentemente negligenciada, porém há estudos que mostram que determinados parâmetros biomecânicos de técnicas de TM podem produzir respostas neurofisiológicas únicas ou dose-dependentes, como uma resposta de hipoalgesia⁸⁸ e resposta à EMG⁷⁵

A literatura tem mostrado de forma ampla os efeitos biomecânicos da TM porém devido a fatores com a falta de resultados duradouros, inespecificidade de aplicação, resultados ocorrerem à distância do local tratado, os efeitos da TM, parecem estar ligados a esta combinação de mecanismos, e com isso, tem sido sugerido que uma

força mecânica é que produz uma cascata de respostas neurofisiológicas que produz estes efeitos nas diferentes técnicas de TM.

Neste sentido, estudos indicam a necessidade de haver um olhar mais aprofundado sobre os mecanismos e efeitos da TM onde Bialosky *et al.*⁸⁹ com base na literatura disponível descreveram um modelo abrangente multifatorial considerando existir uma interação entre os efeitos biomecânico e neurofisiológico e não uma distinção entre eles, afim de direcionar futuras pesquisas^{89,90}.

Esses modelos multifatoriais foram descritos tentando explicar o efeito das técnicas de TM no tratamento da dor. Acredita-se que estas técnicas podem ter efeitos sobre os tecidos locais e que também podem suprimir a dor pela ativação de mecanismos neurofisiológicos a níveis espinais ou supra-espinais⁹¹.

No mecanismo periférico, mediadores inflamatórios e nociceptores periféricos interferem no processamento da dor e técnicas de TM reduzem significativamente as concentrações de citocinas quando comparadas com falsa TM ou grupo controle⁹², aumentam as concentrações de β -endorfinas, anandamida, N-palmitoiletanolamida e serotonina⁹³, canabinoides endógenos⁹⁴, e liberação de mediadores de resolução de inflamação como as resolvinas²³.

A TM exerce efeito a nível espinal onde especula-se que informações de entradas sensoriais originária dos proprioceptores bombardeiem o sistema nervoso central. O mecanismo central (espinal), tem em estudos pré-clínicos, uma evidência direta de sua ação, como por exemplo quando aplicado a TM após injeção de capsaicina em ratos verificou-se por ressonância funcional magnética uma resposta na medula espinal com uma ativação diminuída do corno posterior da medula espinal quando aplicado um toque suave na pata dos animais⁹⁵.

1.1.3.1 Mobilização articular

A mobilização articular é uma técnica comumente utilizada na reabilitação com o propósito de melhorar a flexibilidade dos tecidos e a mobilidade das articulações e com isso promover o reestabelecimento da função. Esta modalidade apesar de existir a milhares de anos, se tornou mais popular no pós-guerra com o propósito de recuperar os feridos em combate⁹⁶. A partir disso vários métodos que empregam a MA foram desenvolvidos como Cyriax, Kaltenborn, Paris e Maitland^{60,97}.

A técnica de Maitland, uma das mais comumente utilizadas, prevê uma graduação biomecânica dos movimentos passivos em quatro graus, sendo o Grau I uma pequena ADM realizado no início da ADM; Grau II maior amplitude dentro da amplitude possível, não atingindo o final da ADM; Grau III grande amplitude realizada até o limite da ADM(Figura 3); e Grau IV pequena amplitude realizada no limite da ADM^{98,99}.

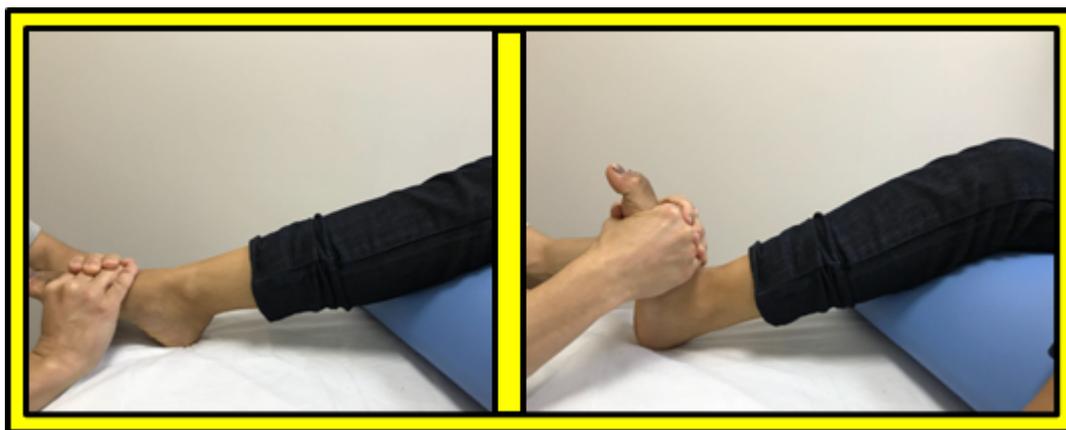


Figura 3 – Aplicação da técnica de mobilização articular grau III em humanos

Além do direcionamento biomecânico da graduação proposta por Maitland, a neurofisiologia também provê bases teóricas para mobilizações específicas, onde quatro tipos de fibras aferentes neuronais conduzem impulsos originados nos receptores das articulações sinoviais, sendo estes designados como Tipo I, Tipo II, Tipo III e Tipo IV. Os três primeiros tipos são fibras que conduzem as aferências até o sistema nervoso central oriundas de mecanorreceptores articulares como as terminações de Rufini, os corpúsculos de Paccini e os órgãos de Golgi. O tipo IV são fibras não mielinizadas que carregam impulsos aferentes nociceptivos originários das terminações nervosas livres¹⁰⁰. A ativação dos mecanorreceptores depende da espessura das cápsulas que guardam os receptores e cada um deles tem características específicas de ativação, limiar, frequência de descarga e adaptação.

Dentro do escopo de técnicas da TM a MA é uma ferramenta simples e eficaz e que conta com vários estudos que mostram seus efeitos e alguns poucos que demonstram seu mecanismo de ação. Em seres humanos, têm sido demonstrado que a MA promoveu melhora significativa da dor e de ADM em indivíduos com quadro de ombro congelado quando adotado um regime de 12 sessões de 10 minutos de mobilização passiva Grau III em um período de 4 semanas¹⁰¹. Em um estudo duplo-

cego em indivíduos com diagnóstico de osteoartrite de quadril, comparando a mobilização articular em 3 grupos com diferentes forças de aplicação, baixa, média e alta por 10 minutos, os autores verificaram que a melhora sobre a ADM é significativa no grupo com alta força de aplicação quando comparado com a baixa e média força de aplicação¹⁰².

A mobilização também se mostrou eficaz na melhora aguda de quadros de instabilidade crônica de tornozelo no teste de salto em um regime de 5 minutos de mobilização articular¹⁰³. Além disso, a MA interfere na excitabilidade córtico-espinal como demonstrado por Fisher *et al.*¹⁰⁴ onde há um aumento da excitabilidade 30 minutos após a técnica de manipulação rápida da articulação do tornozelo ao contrário da MA periférica lenta que não apresenta tal aumento na excitabilidade córtico-espinal. Este período de 30 minutos é clinicamente significativo pois é relacionado ao período de aquisição de habilidades motoras e modulação do movimento.

Um outro estudo mostra que os limiares de dor à pressão e vibração aumentam quando aplicado um regime de 2 minutos de mobilização em comparação com somente o posicionamento das mãos¹⁰⁵. Celik *et al.*⁶² mostrou que em pacientes com fascíte plantar há uma melhora da dor e função através da MA por até 12 semanas em comparação com infiltrações com esteroides⁶².

Em estudos pré-clínicos, foi observado em um modelo animal de dor inflamatória que utilizou uma injeção intra-articular de capsaicina, que a MA inibiu a nocicepção induzida por este agente flogístico com um regime de tratamento de 9 minutos perdurando por 30 minutos após a aplicação da MA¹⁶. Martins *et al.*¹⁷ demonstraram que a MAT em animais tem efeitos agudos sobre a hiperalgesia mecânica com um regime de 9 minutos de tratamento comparado com um regime de 3 minutos e com controles. Ainda neste estudo, a administração de naloxona preveniu o efeito analgésico da MAT, mostrando evidência para o envolvimento do sistema opioide^{16,17,106}. Resultados similares mostram em humanos que a hiperalgesia testada através do reflexo flexor de retirada com um estímulo elétrico cutâneo supra-limiar é reduzida quando os indivíduos recebem a MA em comparação com controles¹⁰⁷.

Este sistema opioidérgico de controle da hiperalgesia no modelo pós operatório se dá pela disponibilidade dos receptores opioides nos neurônios sensoriais no sítio da lesão e não pela quantidade de neutrófilos que contém opioides infiltrados pelo processo inflamatório gerado pela incisão¹⁷. É conhecido que os leucócitos contribuem para a geração da dor mas também produzem mediadores de controle da dor que

atuam na interação entre os opioides derivados das células imunes e os receptores opioides¹⁰⁸. Quando do pré tratamento em ratos com fucoidina, que tem por função inibir o “rolamento” dos leucócitos no endotélio capilar levando a uma redução destes no local inflamado, esta não previne a anti-hipersensibilidade gerada pela TM, indicando que a TM não atua pelo mecanismo de recrutamento de neutrófilos que contém opioides para o sitio da lesão¹⁷

Outro mecanismo envolvido no controle da hiperalgisia mecânica investigado no modelo de dor pós-operatória foi o sistema adenosinérgico. Foi então demonstrado que a administração dos antagonistas para receptores adenosinérgicos (cafeína ou DPCPX) tanto periféricamente quanto centralmente, preveniu o efeito anti-hiperalgésico da MAT²¹. Além destes mecanismos supra citados, dados evidenciam o envolvimento do sistema canabinóide no controle da hiperalgisia mecânica pós-operatória tanto centralmente através da ativação do receptor CB₁, quanto periféricamente por meio do receptor CB₂²².

Outro destaque da MA que ocorre em paralelo à redução da hiperalgisia é a interação das células gliais em um modelo de dor neuropática por axoniotmese. Com um regime de 9 minutos de MA, Martins *et al.*¹⁰⁹ demonstraram, além de uma redução da hiperalgisia mecânica e também ao frio, análise histológica mostrou uma diminuição da ativação das células gliais no corno dorsal da medula espinal e também uma maior espessura da bainha de mielina. Possivelmente estes resultados estão relacionados entre si demonstrando uma possibilidade de auxílio para indivíduos com dor crônica, onde estudos em humanos mostram que estes tem um aumento da ativação glial cerebral¹¹⁰ e em animais esta ativação glial a nível espinal¹¹¹.

A pesquisa do mecanismo de ação e dos regimes de aplicação, é imprescindível para a evolução das técnicas de mobilização articular e com isso aprimorar os resultados clínicos. A análise da participação do receptor FPR2/ALX através da MAT até o presente momento é inexistente, tendo então este estudo um caráter inédito e possivelmente esclarecedor sobre os mecanismos de ação da MAT na fase pró-resolutiva do processo pós-operatório. A evolução clínica e científica depende não somente do estudo dos resultados das técnicas propostas, mas também do entendimento de seu mecanismo para que novos estudos sejam conduzidos, novas abordagens sejam desenvolvidas e melhores resultados sejam alcançados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais no efeito anti-hiperalgésico da MAT em camundongos submetidos ao modelo de dor pós-operatória.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em camundongos submetidos ao modelo de dor pós-operatória pretende-se analisar:

- A ação do BML-111 na hiperalgisia mecânica, edema e temperatura da pata;
- O efeito da MAT realizada em duas velocidades (lenta e rápida) na hiperalgisia mecânica, edema e temperatura da pata;
- O envolvimento dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais na ação do BML-111 sobre a hiperalgisia mecânica;
- O envolvimento dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais sobre a anti-hiperalgesia induzida pela MAT.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa é caracterizada como um estudo não clínico do tipo experimental.

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Para a execução deste estudo os seguintes material e equipamentos foram utilizados: monofilamento de von Frey de 0,6g (VFH, Stoelting, Chicago, USA); micrômetro universal digital da marca Insize (Loganville, Georgia, EUA); câmera termográfica FLIR-E63900, T198547 FLIR Systems (Suécia); e o antagonista WRW4 e agonista BML-111 para o receptor FPR2/ALX (Tocris Biosciences, Bristol, Reino Unido).

3.3 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25 a 35 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, aclimatados no Biotério de manutenção do Laboratório de Neurociências Experimental (LaNex) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), por pelo menos duas semanas antes dos experimentos. Serão mantidos sempre a uma temperatura de 22 ± 2 °C, com ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 6h00), com acesso a ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e aclimatados no laboratório experimental 1h antes dos testes.

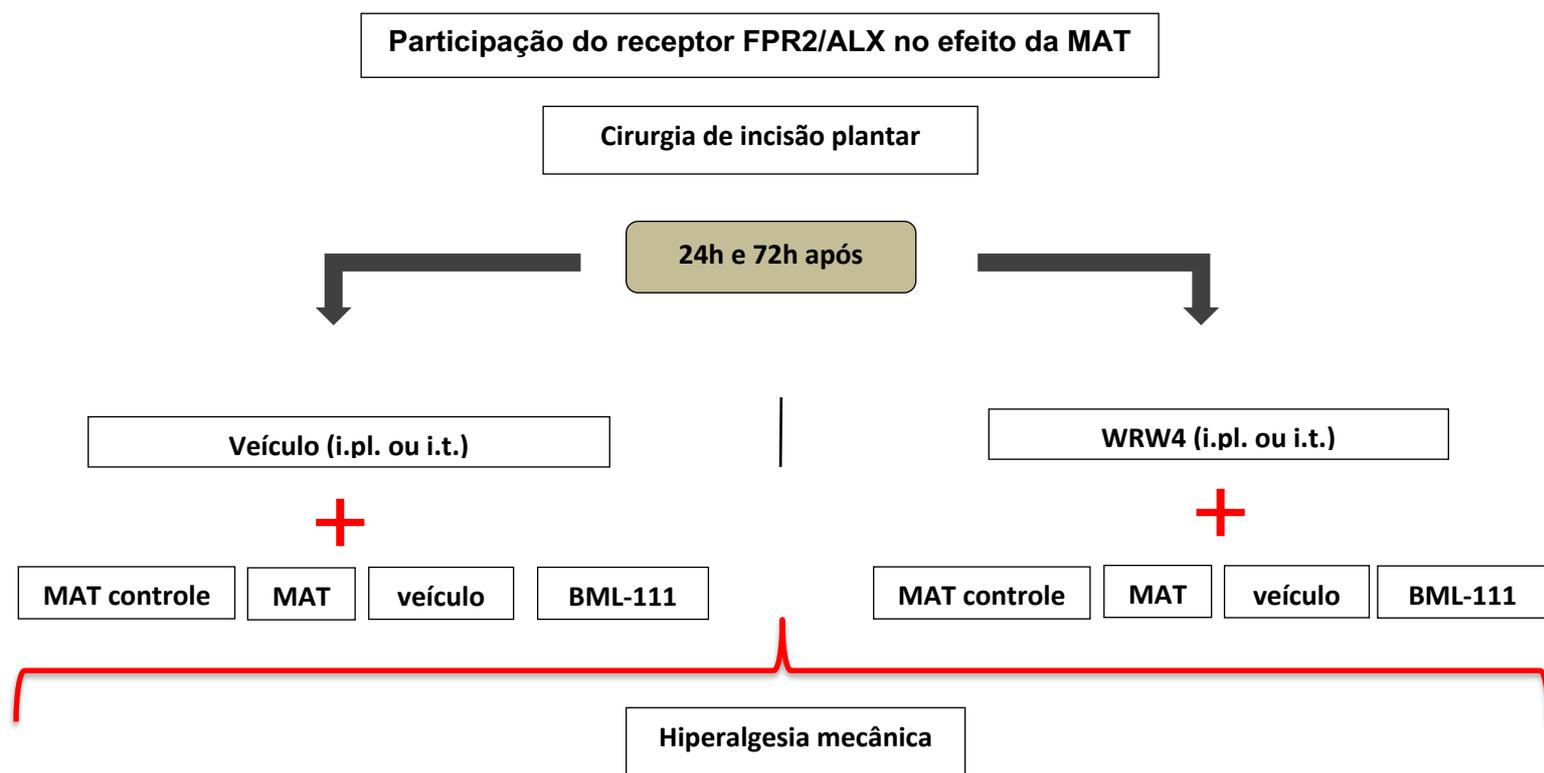


Figura 5 – Delineamento da avaliação da participação do receptor ALX/FPR2 no efeito da MAT.

3.5 TESTES

3.5.1 Modelo animal de dor pós-operatória

O modelo de dor pós-operatória induzido pela CIP foi realizado conforme previamente descrito por Pogatzki e Raja²⁹. Neste procedimento os camundongos foram anestesiados com 1–2% de isoflurano a 100% de O₂. Foi realizada uma incisão longitudinal de 5 mm na pele e fáscia da parte plantar da pata com um bisturi de lamina número 11 e então a pele foi suturada com um fio de nylon 6.0 mm e a sutura coberta com solução povidine-iodo® 10%(Figura 6). Para a recuperação, os animais foram mantidos em suas caixas moradias e observados até a recuperação da anestesia.



Figura 6 – Etapas de execução do procedimento de indução do modelo de dor pós-operatória através da incisão plantar.

3.5.2 Técnica de mobilização articular em camundongos

Para a realização da MAT, os animais foram anestesiados com 1–2% de isoflurano a 100% de O₂. A MAT foi realizada na pata traseira direita (operada) mantendo a articulação do joelho estabilizada e com um movimento rítmico de flexão e extensão da articulação do tornozelo até o final da amplitude do movimento articular^{16,17} como visto na figura 7. A caracterização da MAT lenta (MATL) foi realizada conforme descrito previamente por Martins *et al.*¹⁷, com uma frequência de aproximadamente 40 movimentos por minuto, enquanto que a MAT rápida (MATR) foi realizada em uma frequência de aproximadamente 80 movimentos por minuto. As MAT foram realizadas com o auxílio de um metrônomo. Os animais tratados receberam um total de 9 minutos de MAT, no entanto, foram realizadas 3 séries de mobilizações com duração de 3 minutos cada, com 30 segundos de intervalo entre cada série¹⁶. Para a caracterização do grupo controle, os animais também foram anestesiados com 1–2% de isoflurano a 100% de O₂ e mantido o contato na pele da pata do animal porém sem a realização da mobilização articular.



Figura 7 – Tratamento com a mobilização articular do tornozelo.

3.5.3 Testes comportamentais

3.5.3.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando os monofilamentos de von Frey (vF, 0,6g) na pata posterior direita do animal¹⁷(Figura 8). Para isto, os animais foram colocados individualmente em câmaras de observação feitas em acrílico (9 x 7 x 11cm) sem fundo e coberta com tampa posicionada sobre uma plataforma feita com tela de arame com malha de 6 mm que possibilitou o livre acesso a superfície ventral das patas dos camundongos.

A aplicação do vF foi realizada na pata posterior direita (com incisão plantar) quando o animal permanecia com as quatro patas apoiadas sobre a tela. A aplicação do vF foi realizada em orientação vertical com pressão suficiente para provocar a curvatura do filamento e mantido até a resposta da retirada da pata que caracteriza a hiperalgesia, ou por até no máximo três segundos¹⁷.

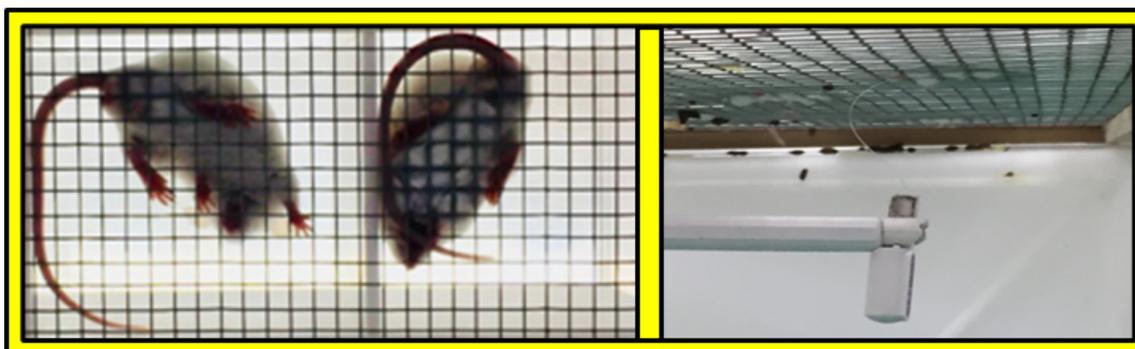


Figura 8 – Avaliação da hiperalgesia mecânica através do filamento de von Frey.

Cada animal recebeu 10 aplicações do vF, as vezes que eles retiraram a pata do contato com a tela foram computadas, sendo registrada a frequência de retirada da pata em porcentagem que indicou a resposta hiperalgésica^{17,112}.

3.5.3.2 Avaliação do edema da pata

A mensuração do edema da pata foi feita através de um micrômetro digital pela determinação da espessura do coxim da pata traseira direita (Figura 9). As medidas foram expressas pela diferença do valor obtido entre a mensuração pré-operatória e as subsequentes. Para esta avaliação foram utilizados os mesmos animais do teste da hiperalgesia mecânica, pois se trata de uma análise não invasiva e não dolorosa¹¹³.



Figura 9 – Avaliação do edema da pata

As avaliações foram realizadas no pré-operatório bem como nas primeiras horas após a CIP (3h, 3h30min, 8h e 8h30), no segundo dia (24h, 25h, 26h, 27h e 28h), no terceiro dia (48h, 49h, 50h, 51h e 52h) e no quarto dia (72h, 73h, 74h, 75h e 76h).

3.5.3.3 Avaliação da temperatura da pata

O registro da temperatura da superfície da pata traseira direita (no ponto médio da face plantar) foi realizado com o auxílio de uma câmera termográfica (Figura 10). As medidas foram expressas pela diferença do valor obtido entre a mensuração pré-

operatória e as subsequentes. Para esta avaliação foram utilizados os mesmos animais do teste da hiperalgesia mecânica, pois se trata de uma análise não invasiva e não dolorosa¹¹⁴.



Figura 10 – Avaliação da temperatura da pata

As avaliações foram realizadas no pré-operatório, bem como nas primeiras horas após a CIP (3h, 3h30min, 8h e 8h30), no segundo dia (24h, 25h, 26h, 27h e 28h), no terceiro dia (48h, 49h, 50h, 51h e 52h) e no quarto dia (72h, 73h, 74h, 75h e 76h).

3.5.3.4 Investigação do envolvimento dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais no efeito anti-inflamatório do BML-111 e da MAT no modelo animal de dor pós-operatória.

A fim de avaliar o envolvimento dos receptores FPR2/ALX periféricos e espinais no efeito anti-inflamatório do BML-111, animais com dor pós-operatória foram pré-tratados com WRW4 (um antagonista para os receptores FPR2/ALX) por via intra plantar (i.pl. 3 ou 10 μ g/pata) ou por via intratecal (3 ou 10 μ g/i.t.) ou salina (20 μ l/i.pl. ou 5 μ l/i.t.) no primeiro e terceiro dia pós-operatório. Quinze minutos após as administrações, os animais receberam o tratamento com BML-111 (3 μ g/s.c.) ou salina (10 ml/kg, s.c.). A hiperalgesia mecânica foi avaliada trinta minutos após os tratamentos¹¹⁵.

Ainda, no primeiro e terceiro dias após CIP, outros grupos de animais com dor pós-operatória foram pré-administrados com o antagonista para o receptor FPR2/ALX, o WRW4 por via i.pl (10 µg) ou por via i.t. (10 µg/) ou salina (20 µl/i.pl. ou 5 µl/i.t.). Quinze minutos após as administrações, os animais receberam os tratamentos com MAT ou controle. A hiperalgesia mecânica foi avaliada trinta minutos após os tratamentos¹¹⁵.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis da participação da MAT no modelo animal de dor pós-operatória.

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)
Temperatura da pata	Dependente	Qualitativa	Graus Celsius (°C) (Média ± desvio padrão)
WRW4	Independente	Qualitativa	(Sim / não)
BML-111	Independente	Qualitativa	(Sim / não)
Mobilização articular lenta	Independente	Qualitativa	(Sim / não)
Mobilização articular rápida	Independente	Qualitativa	(Sim / não)
CIP	Independente	Qualitativa	(Sim / não)

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados no programa *Graph Pad Prism* na versão 6.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). A distribuição normal dos dados foi analisada por meio do teste de *Shapiro – Wilk*. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (D.P.). Os dados foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de *Tukey* ou teste de *Bonferroni*. Em todas as análises, valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi encaminhado para Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL e aprovado, sob o protocolo número 17.009.2.007.IV. 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 conscientes¹⁶. O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram o mínimo necessário para demonstrar o consistente efeito ao tratamento recebido.

A Morte Indolor Assistida/Eutanásia (MIA) dos animais foi realizada por meio de uma injeção intraperitoneal de uma dose excessiva de anestésico de acordo com a resolução 1000 de 20/06/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) sob a supervisão de médico veterinário responsável.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM BML-111 NA HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados apresentados na Figura 11A mostram o efeito de diferentes doses do tratamento com BML-111 sobre a frequência de respostas de retirada da pata ao estímulo mecânico com o filamento de vF. Pode-se observar que no primeiro dia após a CIP, o tratamento com BML-111 reduziu significativamente a frequência de resposta de retirada da pata em 0,5h, na doses de 3 µg/s.c. ($p = 0,003$) e 10 µg/s.c. ($p < 0,001$) e até 1h após o tratamento somente na dose de 3 µg/s.c. ($p = 0,018$), quando comparados com o grupo controle (Figura 11A). No terceiro dia após a CIP, somente a dose de 3 µg/s.c. de BML-111 reduziu ($p < 0,001$) a hiperalgesia mecânica, 0,5h após o tratamento (Fig. 11B).

A figura 11C mostra que o tratamento diário com BML-111 na dose de 3 µg/s.c. foi capaz produzir efeito anti-hiperalgésico no primeiro ($p < 0,001$), segundo ($p < 0,001$), terceiro ($p < 0,012$) e quarto ($p < 0,001$) dias após a CIP. A partir desses achados a dose de 3 µg/s.c. foi escolhida para os demais experimentos.

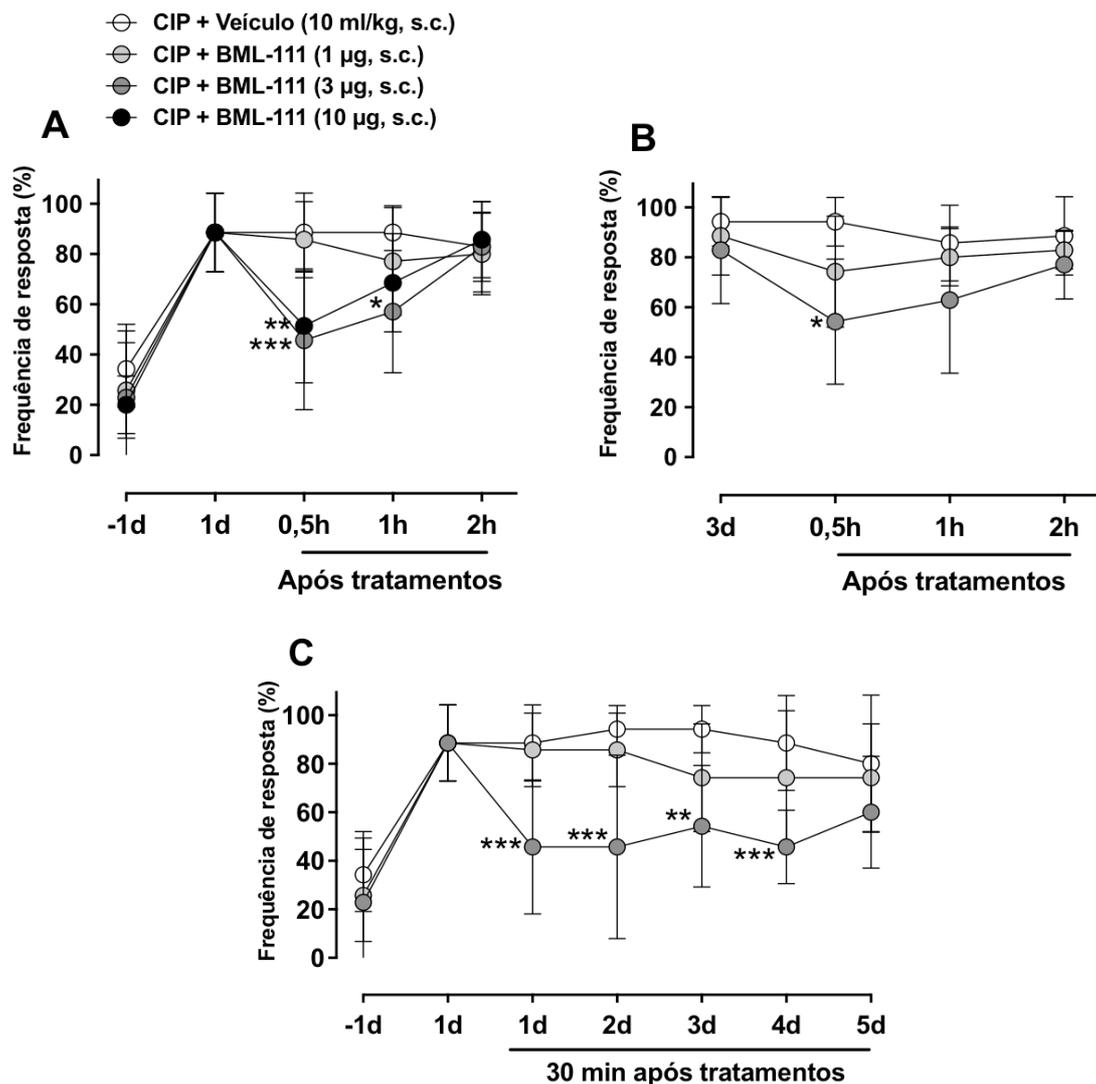


Figura 11 – Efeitos do tratamento com BML-111 na hiperalgesia mecânica. Avaliação em decurso temporal do tratamento com BML-111 no primeiro (painel A), terceiro (painel B) e quinto (painel C) dia após a CIP. Avaliação do tratamento diário por 5 dias consecutivos (painel D). Os valores representam a média \pm DPM ($n = 7$ animais). Considera-se $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$, quando comparados com o grupo CIP + veículo (10ml/kg. s.c.). Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. CIP: cirurgia de incisão plantar; s.c.; subcutâneo.

4.2 COMPARAÇÃO DO EFEITO DE DUAS VELOCIDADES DA MAT NA HIPERALGESIA MECÂNICA

A figura 12, painel A, demonstra que a MATL, no primeiro dia após CIP, reduziu significativamente a frequência de resposta de retirada da pata em 30 ($p = 0,011$) e 45 ($p = 0,001$) minutos após o tratamento. No entanto, o tratamento dos animais com MATR não reduziu a frequência de resposta de retirada da pata dos animais.

No terceiro dia após CIP a MATL também apresentou diferença significativa, porém somente 30 minutos ($p < 0,001$) após o tratamento (Figura 12B).

Os resultados apresentados na Figura 12C mostram que a CIP induziu o aumento da frequência de respostas de retirada da pata indicando hiperalgesia mecânica até o terceiro dia, quando comparados com os valores basais. O tratamento diário com MATL apresentou redução significativa na hiperalgesia mecânica em até três dias ($p < 0,046$) após a CIP e que a MATR não alterou a hiperalgesia mecânica.

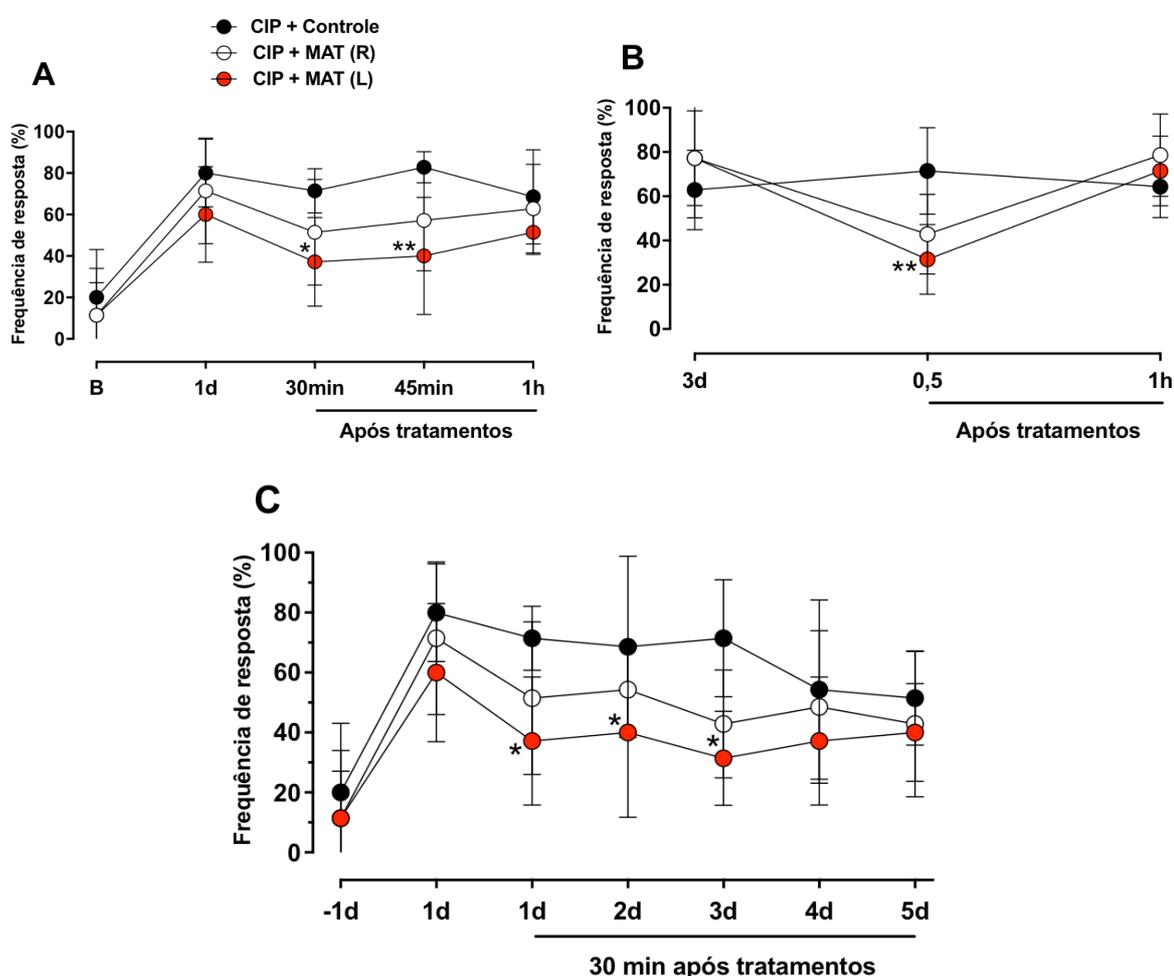


Figura 12 - Efeitos do tratamento com MAT em duas velocidades na hiperalgesia mecânica. Avaliação do decurso temporal do tratamento com MAT lenta e rápida no 1º (painel A), 3º (painel B) e avaliação diária por 5 dias consecutivos (painel C). Os valores representam a média \pm DPM ($n = 8$ animais). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo controle. Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. CIP: cirurgia de incisão plantar; MATR mobilização articular do tornozelo rápida; MATL: mobilização articular do tornozelo lenta.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATL E DO BML-111 NO EDEMA DA PATA

Os resultados apresentados na figura 13A demonstraram que a CIP apesar de aumentar os valores médios da espessura da pata dos animais nos tempos avaliados, não foi possível encontrar diferença entre os grupos analisados. Além disso, verificou-se que o tratamento agudo com BML-111 ou MATL não foram capazes de alterar a espessura (edema) de pata dos animais. Nenhuma influência dos tratamentos foram verificadas nas avaliações em 24h, 48h ou 72h após a CIP, em até 4h após os tratamentos (Fig. 13 B-D).

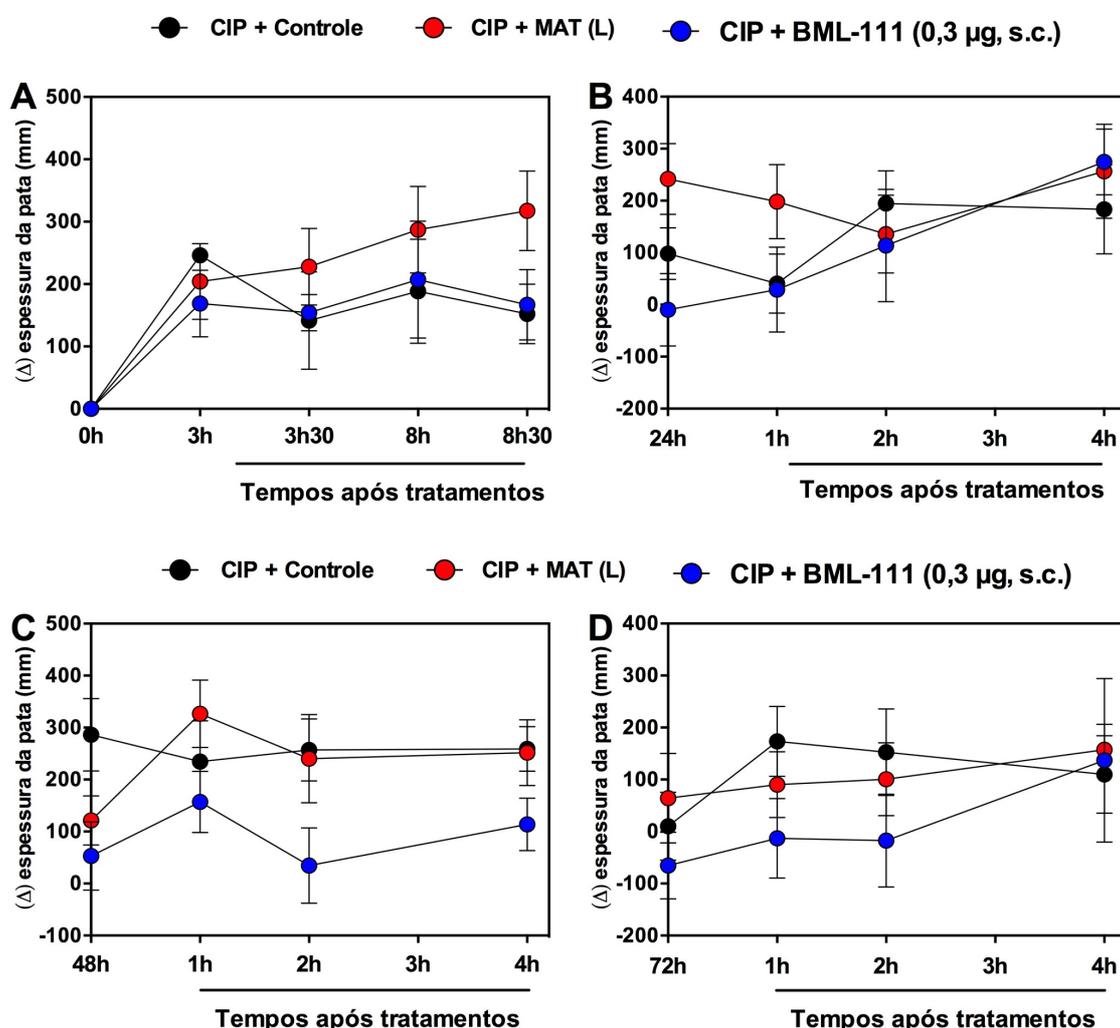


Figura 13 - Efeitos do tratamento com MAT e com BML-111 no edema da pata. Avaliação do efeito do tratamento agudo com MATL e BML-111 (painel A), avaliação do decurso temporal com 24h (painel B) 48h (painel C) e 72h (painel D) da CIP. Os valores representam a média \pm DPM ($n = 8$ animais). Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. CIP: cirurgia de incisão plantar; MATL: mobilização articular do tornozelo lenta; s.c.; subcutâneo.

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATL E DO BML-111 NA TEMPERATURA DA PATA

A figura 14A mostra que a CIP, tampouco o tratamento agudo no primeiro dia com MATL ou BML-111 após 3h ou 8h da CIP não alteraram a temperatura da pata. No entanto, vinte e quatro horas após a CIP, o tratamento com a MATL produziu aumento da temperatura da pata 2h ($p = 0,002$, Fig. 14B) após o tratamento quando comparado com o grupo CIP controle.

Na figura 14, observa-se que em 48h após a CIP (painel C) o grupo MATL apresenta uma maior ($p = 0,049$) temperatura da pata comparado ao grupo controle e que os tratamentos tanto com a MATL ($p = 0,047$) quanto com o BML-111 ($p = 0,030$) produziram uma redução na temperatura da pata 4h após os tratamentos quando comparados com o grupo controle. Em 72h após a CIP, somente o tratamento com BML-111 reduziu ($p = 0,045$) a temperatura da pata 4h após o tratamento (painel D).

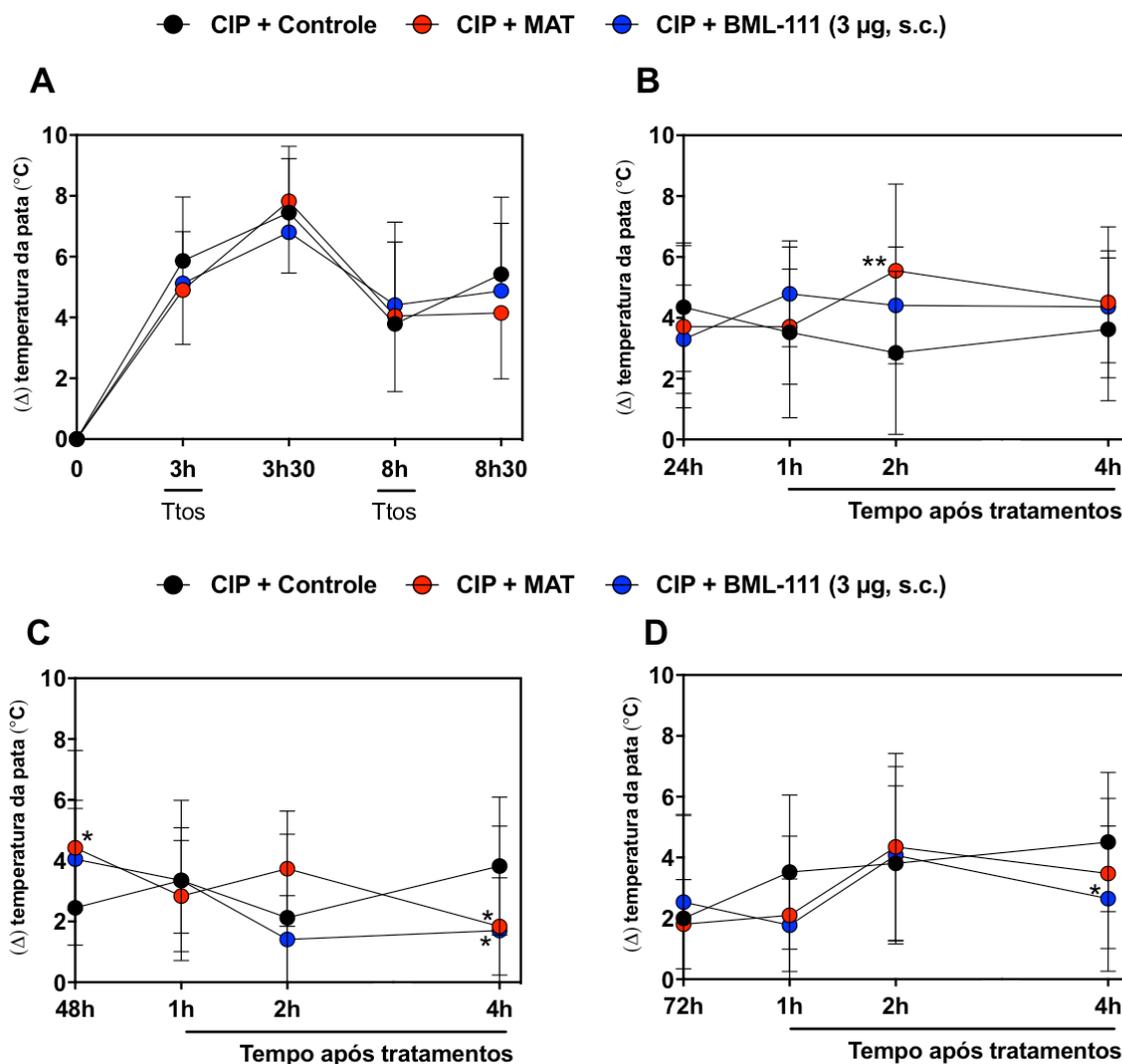


Figura 14 - Efeitos do tratamento com MAT ou BML-111 na temperatura da pata. Avaliação do efeito do tratamento agudo com MAT lenta e BML-111 (painel A), avaliação em decurso temporal com 24h (painel B) 48h (painel C) e 72h (painel D) da CIP. Os valores representam a média \pm DPM ($n = 8$ animais). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo CIP + controle. Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. CIP: cirurgia de incisão plantar; MAT (L): mobilização articular do tornozelo lenta; s.c.; subcutâneo.

4.5 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO E ESPINAL NO EFEITO ANTIHIPERALGÉSICO DO BML-111

Os resultados das figuras 15 e 16 ilustram o efeito da administração i.pl. e i.t. de WRW4 de 3 e 10 µg/sítio, respectivamente, sobre o efeito anti-hiperalgésico do BML-111. Foi observado que no primeiro dia pós-operatório a dose de 3 µg de WRW4 não foi capaz de prevenir ($p > 0,999$) o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 tanto na

pata quando na medula espinal (Figura 15A e 15C). No entanto, quando administrada a dose de 10 μg de WRW4, foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 tanto na pata ($p < 0,001$) quanto na medula espinal ($p < 0,001$, figura 15B e 15D).

No terceiro dia após a CIP nos camundongos, a administração de 3 μg de WRW4 na pata ou na medula espinal dos camundongos também não preveniu o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (Figura 16A e 16C). Já a administração de 10 μg de WRW4 na pata ($p < 0,001$) não foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (Figura 16B), porém, na medula espinal ($p = 0,05$) essa mesma dose foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (figura 16D).

Dia 1 - pós-operatório

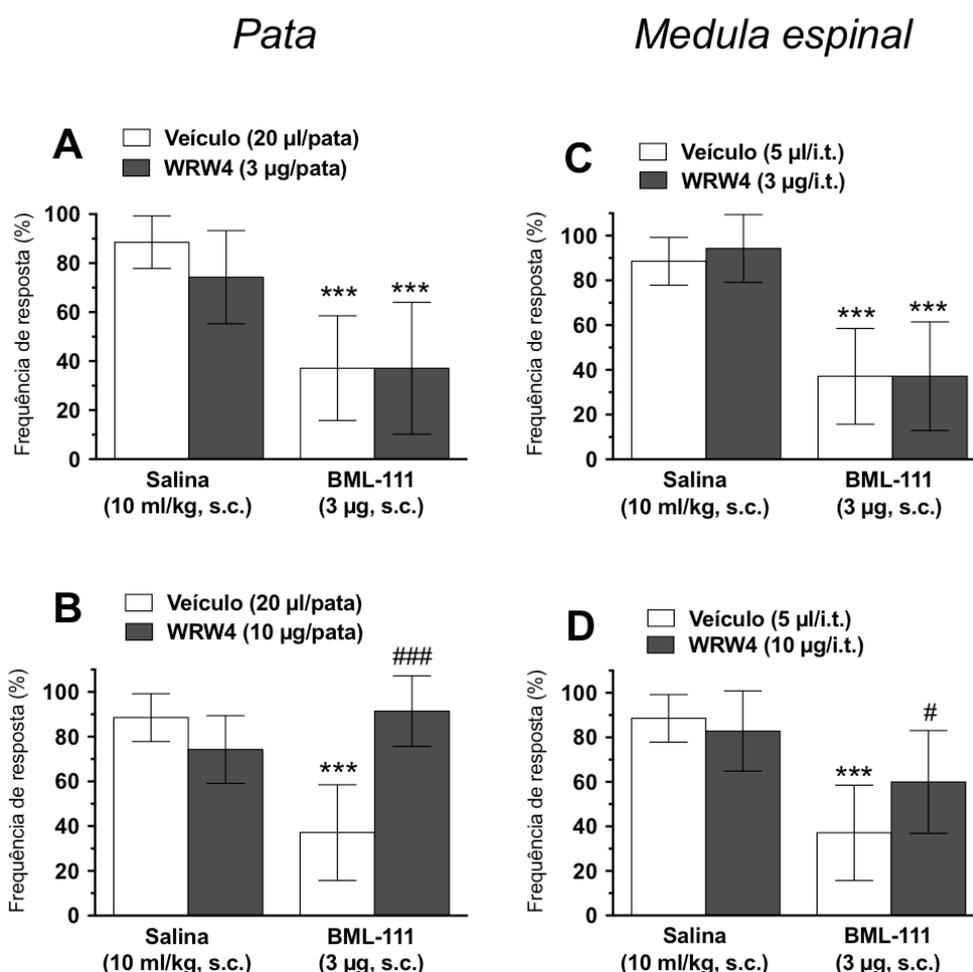


Figura 15 – Avaliação do envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico do BML-111 no primeiro dia após a cirurgia de incisão plantar. Efeito da administração de i.pl. (painel A-B) e i.t. (painel C-D) de WRW4 sobre o efeito anti-hiperalgésico do BML-111. Os valores representam a média \pm DPM ($n = 8$ animais). Análise de variância de uma via seguida pelo teste de Tukey. s.c.; subcutâneo; i.t.: intratecal.

Dia 3 - pós-operatório

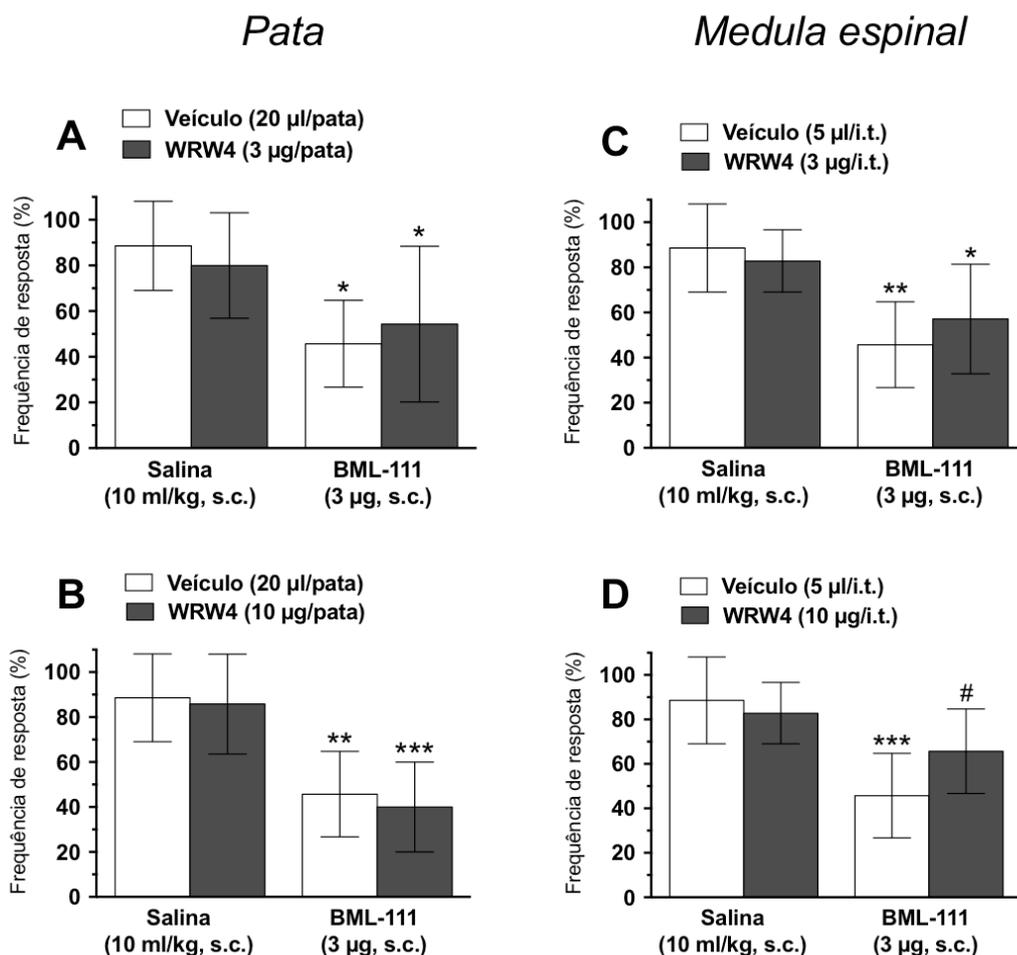


Figura 16 – Avaliação do envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico do BML-111 no terceiro dia após a cirurgia de incisão plantar. Efeito da administração de intraplantar (painel A-B) e intratecal (painel C-D) de WRW4 sobre o efeito anti-hiperalgésico do BML-111. Os valores representam a média \pm DPM ($n = 8$ animais). Análise de variância de uma via seguida pelo teste de Tukey. s.c.: subcutâneo; i.t.: intratecal.

4.6 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO E ESPINAL NO EFEITO ANTI-HIPERÁLGÉSICO DA MATL

A figura 17 ilustra o efeito da administração do antagonista WRW4 sobre o efeito da MAT. Neste experimento verificou-se que a administração i.pl. de WRW4 (10 µg/sítio) preveniu o efeito anti-hiperalgésico da MAT tanto no primeiro ($p = 0,028$) quanto no terceiro ($p = 0,001$) dia após a CIP (painéis A e C). Além disso, o WRW4 (10 µg/sítio) quando administrado por via i.t. também foi capaz de prevenir o efeito

anti-hiperalgésico da MAT tanto no primeiro ($p = 0,002$) quanto no terceiro ($p = 0,001$) dia após a CIP (painéis B e D).

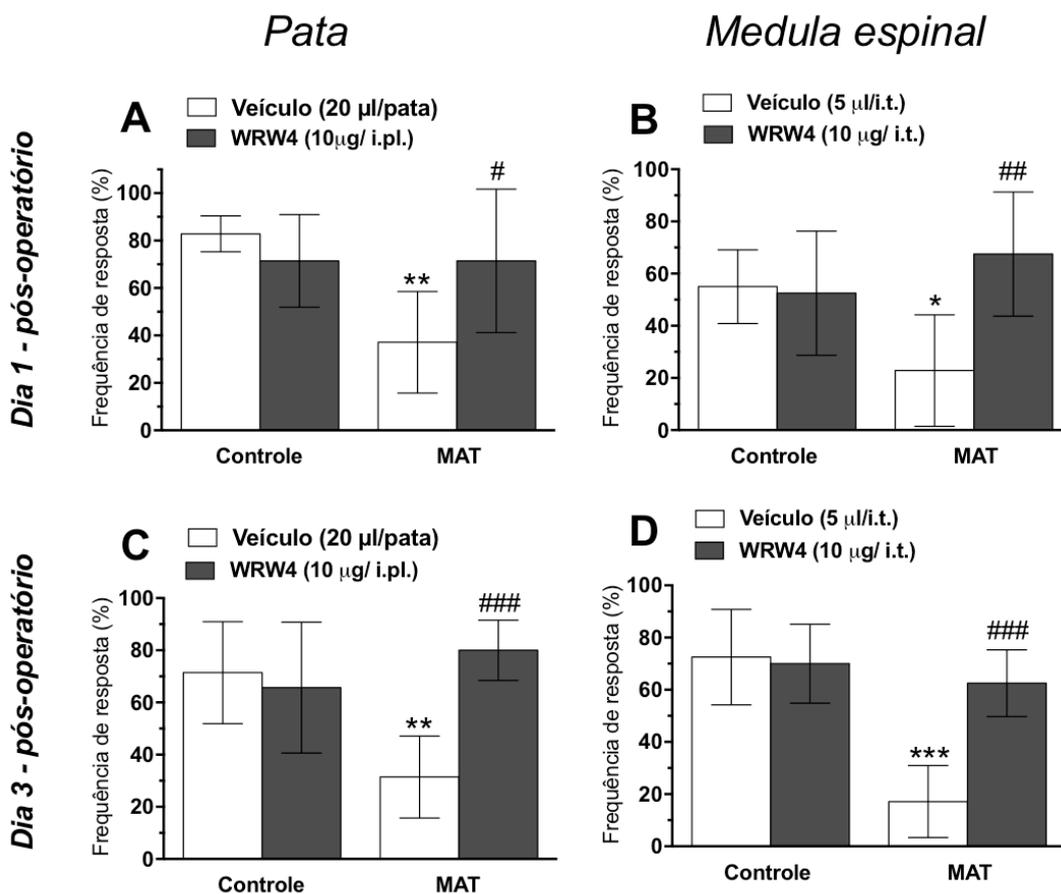


Figura 17 – Avaliação do envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico da MAT no primeiro e terceiro dia após a CIP.

Efeito da administração i.pl. (painel A-B) e i.t. (painel C-D) de WRW4 sobre o efeito anti-hiperalgésico da MAT no primeiro e terceiro dia após a CIP. Os valores representam a média \pm DPM ($n = 8$ animais). Análise de variância de uma via seguida pelo teste de Tukey. CIP: cirurgia de incisão plantar; s.c.; subcutâneo; i.t.: intratecal.

5. DISCUSSÃO

Indivíduos submetidos a cirurgias geralmente apresentam dor pós-operatória aguda (DPOA) geralmente se recuperam dela com o reparo da ferida cirúrgica. No entanto, em alguns casos a dor aguda pode evoluir para dor crônica. A presença de dor (hiperalgesia e/ou alodínia) retarda todo o processo de recuperação pós-cirúrgica. Apesar da utilização de estratégias preventivas e analgésicas, como anti-inflamatórios não-esteroidais, opioides, gabapentina e pregabalina, 50%-70% dos pacientes cirúrgicos ainda apresentam DPOA de moderada a grave¹¹⁷. A reação inflamatória pós-cirúrgica deve ser ativamente resolvida, prevenindo lesões teciduais adicionais. Isso ocorre com a prevenção da progressão da inflamação aguda-resolutiva para crônica-persistente, por meio da produção de mediadores pró-resolutivos¹¹⁸.

Entre os cuidados do paciente pós-cirúrgico, a fisioterapia se destaca por manter a funcionalidade do indivíduo, reduzindo a perda de massa muscular, a ADM e promovendo a analgesia¹¹⁹. Para esse fim, técnicas de MA são geralmente realizadas precocemente. Neste sentido, no presente estudo se questionou o possível envolvimento de um mecanismo pró-resolutivo no efeito anti-hiperalgésico da MAT em camundongos após a incisão plantar. Os principais achados deste estudo demonstraram que a MAT é efetiva em reduzir a hiperalgesia mecânica em um modelo animal de dor pós-operatória e que esse efeito é mediado, pelo menos em parte, por receptores FPR2/ALX periféricos e espinais.

Os primeiros experimentos desse trabalho foram voltados na caracterização do efeito do BML-111, um agonista do receptor FPR2/ALX no modelo animal de dor pós-operatória e na comparação dos efeitos entre a MAT lenta e a MAT rápida do tornozelo. Assim, pela primeira vez na literatura, foi demonstrado que o tratamento com BML-111 reduziu a hiperalgesia mecânica tanto no tratamento agudo quanto nos tratamentos diários.

A escolha do modelo experimental de nocicepção (dor) aguda na pata induzida por incisão plantar deveu-se ao fato de que este é um modelo bem caracterizado que permite quantificação da hiperalgesia mecânica e edema de forma rápida e confiável. Além disso, a combinação da transecção da pele e fáschia muscular se compara bem ao trauma tecidual de pacientes submetidos à cirurgia¹²⁰. Assim como os pacientes após a cirurgia, os roedores desenvolvem um comportamento de guarda - dor não evocada - de curta duração (período de aproximadamente 2 dias após a incisão) e um

comportamento relacionado com a dor evocada de longa duração à estímulos mecânicos (von Frey); Esses comportamentos relacionados a dor em animais são vistos como equivalentes aos comportamentos de dor não evocada em repouso (com duração de alguns dias) e de dor evocada (com duração de vários dias até semanas) após cirurgia, em humanos, sendo portanto relevantes para avaliar a dor pós-operatória nestes pacientes¹²¹.

No presente estudo, o tratamento agudo com MATL, mas não MATR produziu efeito anti-hiperalgésico breve, no primeiro e terceiro dia pós-operatório. Com tratamentos diários o efeito anti-hiperalgésico da MATL se manteve por todo o período avaliado. Assim, esses resultados confirmam e estendem os dados do nosso grupo literatura por demonstrar que a MATL, mas não a MATR reduziu a hiperalgesia mecânica induzida por incisão plantar em camundongos^{16,17}.

Efeito terapêutico como a redução da hiperalgesia mecânica tem sido encontrado após a realização de técnicas de MA lenta em modelos animais à quase duas décadas. Em 2001, Sluka e Wright¹⁶ analisaram o efeito da MA lenta do joelho em ratos submetidos à injeção intra-articular de capsaicina no tornozelo. Eles verificaram que somente 9 e 15 minutos de MA lenta, mas não 3 minutos, reduziram a hiperalgesia mecânica por até 30 minutos após os tratamentos. Assim os autores concluíram que a MA lenta do joelho (por 9 ou mais minutos de duração) reduziu a hiperalgesia mecânica. Com base no estudo supra-citado, Martins *et al.*¹⁷ corroboraram e estenderam os achados por demonstrar que a MATL também reduziu a hiperalgesia mecânica quando realizada por 9 minutos, mas não por 3 minutos em animais com dor pós-operatória.

Aqui foi demonstrado que a MATR não produziu efeito sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela incisão plantar. Isso claramente demonstra que o parâmetro velocidade da técnica está diretamente relacionado a sua eficácia. Esses achados podem estar relacionados aos aferentes sensoriais que inervam a articulação do tornozelo (principalmente a cápsula articular). Conforme descrito no capítulo introdutório desse trabalho, quatro aferentes sensoriais levam as informações sensoriais (tato, pressão, vibração, propriocepção e nocicepção) da articulação ao sistema nervoso central (SNC)¹²². Dentre eles as terminações de Ruffini são acionadas tanto ao repouso quanto ao movimento sendo que ao repouso contribuem na percepção da posição articular e controle do tônus e ao movimento no controle da locomoção. As terminações de Ruffini possuem um baixo limiar de ativação,

especialmente por estimulação lenta e prolongada e que aumenta sua frequência de disparo quando há estiramento da capsula articular. Além das terminações de Ruffini, deve-se levar em consideração os corpúsculos de Pacini que tem como característica de ativação a velocidade da movimentação articular no início e final da ADM, respondendo à um aumento rápido da tensão na capsula articular gerando uma curta descarga menor que 0,5 segundos, sendo que esta terminação se mostra inativa quando na posição estática. Devido à esta rápida e curta ativação, é considerado um mecanoreceptor reflexogênico e de aceleração, que se ativa quando realizado técnicas de oscilação no início ou final das ADM^{100,122}.

Sendo assim, sugere-se que o efeito encontrado no presente estudo produzido pela MAT possa estar relacionado à ativação das terminações de Ruffini pelo fato de que esses mecanorreceptores apresentam características de adaptação lenta que podem gerar respostas similares àquelas encontradas ao longo de horas ou dias de tratamento. Além disso, o fato de que a MAT rápida não apresentou resultados positivos pode estar relacionado a característica de adaptação rápida e do mecanismo reflexogênico e de aceleração dos corpúsculos de Pacini que devem ser mais ativados com a MAT rápida. No entanto, somente futuros estudos que analisem especificamente a atividades desses mecanorreceptores durante diferentes velocidades de MAT, poderão esclarecer esses efeitos.

Um intrigante fenômeno observado no presente estudo foi avaliação do efeito da MAT lenta sobre a temperatura e edema de pata. Contrariamente ao esperado, os tratamentos com MATL após incisão plantar, aumentaram em 24h: 4h após o tratamento e em 48h) a temperatura da pele da pata. A primeira vista, esses resultados poderiam indicar um aumento do processo inflamatório, uma vez que o rubor é um sinal cardinal da inflamação. No entanto, é importante analisar o processo inflamatório levando em consideração todos os sinais e sintomas avaliados. Assim, pode-se notar que a espessura da pata (edema, nesses tempos) do grupo que recebeu MAT lenta não alterou quando comparada com a espessura do grupo controle. Isso nos leva a concluir que o efeito da MAT lenta sobre a pata não aumentou o edema, alterando a dilatação dos vasos da pata, mas não a permeabilidade. Esses achados, juntamente o efeito anti-hiperalgésico da MAT sugerem fortemente que o aumento da temperatura pode estar associado a um efeito benéfico como a promoção da limpeza ou drenagem de mediadores pró-nociceptivos ou inflamatórios no local da lesão e facilitando a

chegada de mediadores anti-nociceptivos, anti-inflamatórios ou mesmo pró-resolutivos.

Neste sentido, Licciardone *et al.*¹²³, utilizando TM com um regime de tratamento de 6 aplicações por 12 semanas observaram redução nas concentrações de TNF- α mas não nas concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10. Esta redução nas concentrações de TNF- α ainda estava relacionada a redução da dor e funcionalidade. Outros dados que corroboram com a hipótese do presente estudo é um estudo *in vitro* de fibroblastos, onde o estiramento repetitivo do tecido, mostrou efeitos relevantes na indução de uma resposta inflamatória da redução da proliferação dos fibroblastos, aumento da apoptose e aumento na produção de citocinas IL-1 β , IL-2 e IL-6. A aplicação de técnicas de TM promoveram redução nas concentrações de IL-6, bem como um aumento na proliferação, sendo que estes resultados são dependentes da dose e da direção aplicada sobre o tecido, mostrando o potencial e a relevância clínica das técnicas de TM na inflamação.^{124,125}

Outro interessante resultado do presente estudo foi a observação de que a administração *i.pl.* do antagonista para o receptor FPR2/ALX (WRW4) preveniu o efeito anti-hiperalgésico da MAT lenta em camundongos com incisão plantar. Esses resultados sugerem o envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da MAT. Adicionalmente, foi demonstrado que a administração *i.pl.* WRW4 também preveniu o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 em camundongos com incisão plantar.

Embora, ainda não tenha sido descrita a expressão do receptor FPR2/ALX no neurônio aferente primário nociceptivo, a sua presença em células inflamatórias que influenciam na atividade neuronal, promovendo a sensibilização desses neurônios já tem sido mostrada. Migeotte *et al.*¹²⁶ relatam a expressão do receptor FPR2/ALX em neutrófilos, monócitos, macrófago, fibroblastos, células dendríticas e células endoteliais. Também tem sido demonstrado que a expressão do receptor FPR2/ALX no mastócito possui função de inibir a sua degranulação¹²⁷.

Intrigantemente, somente há poucos anos atrás, investigaram-se as respostas de células inflamatórias periféricas após incisão plantar em animais. Neste sentido, tem sido mostrado que a migração de neutrófilos para tecidos traumatizados por incisão ocorre logo após a cirurgia, atingindo um máximo em 24 horas e declinando rapidamente às concentrações basais em 3 dias¹²⁸. Uma vez que neutrófilos liberam muitos mediadores pró-inflamatórios e peptídeos opioides endógenos (metencefalina

e b-endorfina)¹²⁹ Sahbaie e colegas¹³⁰ demonstraram que a depleção sistêmica de neutrófilos reduziu o edema da pata e IL-1b, mas aumentou significativamente a hiperalgesia ao calor por 24 horas, não alterando a hiperalgesia mecânica após a incisão plantar em camundongos. Isso sugere um papel dos opioides endógenos (de origem neutrofilica) na modulação da dor incisional semelhante à apresentada em modelos de dor inflamatória¹³¹.

Por outro lado, no estudo de Carreira et al.¹²⁸ utilizando o mesmo método para depleção de neutrófilos, mostrou-se uma atenuação da hiperalgesia mecânica após a incisão; Eles também sugeriram o papel da quimiocina CXCL-1 e da ativação do seu receptor CXCR1 no recrutamento de neutrófilos após a incisão. Presumivelmente, os neutrófilos podem desempenhar um papel importante na hiperalgesia após a incisão. No entanto, seu exato papel na dor pós-operatória não está claro atualmente, devido aos resultados contraditórios de ambos os estudos de sua depleção¹³⁰. O papel dos mastócitos também tem sido investigado no modelo de incisão plantar em camundongos. Assim, foi demonstrado que a prevenção da degranulação dos mastócitos pela estabilização da membrana dos mastócitos com cromoglicato ou o esgotamento dos mediadores dos mastócitos (com o Composto 48/80 antes da incisão), inibindo assim o efeito da histamina, 5-HT e triptase (uma serina protease localizada exclusivamente em mastócitos) reduzem a hiperalgesia mecânica e a dor não-evocada em camundongos^{132,133}. Esses resultados sugerem uma contribuição dos mastócitos na hiperalgesia após a incisão plantar.

Assim, é plausível especular que o efeito anti-hiperalgésico da MATL esteja relacionado a liberação de algum mediador pró-resolutivo que possa ativar o receptor FPR2/ALX. Berrueta e colaboradores²³ demonstraram pela primeira vez, que uma técnica de TM (alongamento miofascial) pode impactar na resolução da inflamação. Eles observaram que o alongamento da fáscia lombar realizado em ratos anestesiados com isoflurano por 10 minutos duas vezes ao dia (semelhante ao presente estudo), reduziu a inflamação e a migração de neutrófilos e aumentou as concentrações de resolvina D1 na fáscia lombar (sítio da inflamação) em animais com inflamação induzida pela injeção de carragenina local. Além disso, a injeção subcutânea de resolvina D1 reproduziu os efeitos do alongamento. Esses resultados demonstram um impacto mecânico direto do alongamento sobre o mecanismo de regulação da inflamação dentro do tecido conjuntivo.

Os autores então especulam que uma possível explicação para seus achados seja devido ao fato que o estiramento do tecido conjuntivo aumenta a produção de mediadores pró-resolutivos especializados pelas células estromais residentes (fibroblastos e / ou macrófagos) e o aumento resultante nos níveis de mediadores pro-resolutivos especializados no tecido reduz o recrutamento de neutrófilos circulantes. Isso poderia ser verdadeiro também para o presente estudo. Levando em consideração que a MAT lenta produz alongamento da cápsula articular do tornozelo e assim estimulando fibroblastos que fazem parte de sua constituição²³. Esse poderia ser um mecanismo periférico pelo qual culminaria na ativação do receptor FPR2/ALX.

No presente estudo, os resultados também mostraram o envolvimento do receptor FPR2/ALX espinal (central) no efeito anti-hiperalgésico da MATL e do BML-111. Essa afirmação deriva do fato de que a administração i.t. de WRW4 também preveniu o efeito anti-hiperalgésico da MATL, bem como do BML-111 em animais com incisão plantar. Assim, esses resultados sugerem a participação do receptor FPR2/ALX espinal no efeito anti-hiperalgésico da MATL e do BML-111.

Muitos estudos têm descrito o papel de células neurogliais da medula espinal na facilitação da dor^{134,135}. Além disso, tem sido demonstrado que a inflamação periférica (como ocorre na incisão) leva à ativação astrocitária e microglial no corno posterior da medula espinal¹³⁶. A administração espinal de inibidores ou moduladores da função dos astrócitos e da microglia bloqueiam o início e a manutenção da dor inflamatória persistente¹³⁷ apoiando o papel dessas células na sensibilização espinal (central). Além disso, Alkatis et al¹³⁸ demonstram que a CIP aumentou a expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) relacionada à ativação de astrócitos na medula espinal de ratos em paralelo ao desenvolvimento de hiperalgesia mecânica nesses animais. Svensson e cols⁵³ constataram que o receptor FPR2/ALX é expresso constitutivamente na medula espinal de ratos e camundongos naives. Eles demonstraram que a injeção de carragenina na pata aumentou a expressão desse receptor em astrócitos, mas não na microglia ou neurônios e que a administração i.t. de LXA₄ diminuiu a hiperalgesia mecânica desses animais. Assim, entende-se que a ativação do receptor FPR2/ALX expresso no astrócito atue contra-regulando a produção de citocinas e quimiocinas e assim reduzindo a sensibilização central e consequentemente a hiperalgesia mecânica.

Interessantemente, Martins et al¹⁰⁹ (2011) observaram que a MAT reduziu a ativação de astrócitos e a hiperalgesia mecânica e ao frio em ratos com neuropatia

periférica. Neste sentido, sugere-se que a ativação do receptor FPR2/ALX expresso no astrócito e a diminuição da ativação deste, pode ser um mecanismo espinal pelo qual a MAT pode reduzir a hiperalgesia mecânica.

Acumuladas evidências mostram que as resolvinas e lipoxinas não estão somente associadas à resolução da inflamação, mas também desempenham importante papel na modulação da dor inflamatória experimental. Quando administradas por via i.t. a LXA₄ reduziu a hiperalgesia ao calor induzida por carragenina⁵³, a hiperalgesia térmica e mecânica associada a dor neuropática após compressão de gânglios sensoriais do nervo espinal¹³⁹ e a hiperalgesia mecânica associada à dor por câncer ósseo¹⁴⁰ em ratos. Além disso, a administração i.t. de resolvina D1 (RvD1), RvD2 e RvE1 reduziu a nocicepção induzida pela formalina, o comportamento nocifensivo induzido por capsaicina e a hiperalgesia mecânica e ao calor induzida por CFA em camundongos¹⁴¹, bem como a hiperalgesia mecânica pós-operatória em ratos¹⁴².

Outra hipótese é a ativação do receptor FPR2/ALX espinal pela ANXA1 liberada pela MAT. Segundo essa hipótese a MAT estimularia o sistema nervoso autônomo (SNA) que pode influenciar a atividade da medula da glândula adrenal, que por sua vez, resulta na liberação de catecolaminas que induz a produção de ANXA1. AnxA1 foi originalmente identificada como responsável pelas ações anti-inflamatórias dos glicocorticoides, além disso, tem sido descrito ser liberada de neutrófilos, monócitos e macrófagos. Foi observado que a administração de peptídeos derivado da AnxA₁₂₋₂₆ reduz o edema de pata e o acúmulo de neutrófilos em vários modelos experimentais¹⁴³.

Há evidências para propor que a manipulação/mobilização articular pode ter efeito sobre estruturas supra-espinais gerando respostas autonômicas. Além disso, tem sido proposto que o SNA está associado a respostas do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA). A transdução de estímulos mecânicos externos (MAT) excita vários mecanorreceptores¹⁴⁴. A descarga desses estímulos inócuos no corno posterior da medula espinal alcança várias regiões do tronco encefálico, incluindo o núcleo central da amígdala, o núcleo paraventricular, bulbo ventrolateral rostral, substância cinzenta periaquedutal), entre outros centros autônomos e endócrinos¹⁴⁴. Os neurônios que produzem o hormônio liberador de corticotropina (CRH) presentes no hipotálamo modulam a resposta do eixo HPA e SNA. Portanto, pode-se argumentar que a MAT também resultaria na coativação de ambos os sistemas, aumentando as

concentrações sanguíneas de catecolaminas e glicocorticoides, os produtos finais desses dois sistemas e assim modulando a resposta inflamatória e a cicatrização.

Evidência para o envolvimento da noradrenalina no efeito da MAT tem sido mostrado por Martins e colaboradores²¹. Os autores demonstraram indiretamente por meio da administração do inibidor da enzima tirosina hidroxilase (Alfa-metil-para-tirosina) que inibindo a produção de noradrenalina nos camundongos previne totalmente o efeito anti-hiperalgésico da MAT. Isso mostra a importância da via noradrenérgica nesse efeito.

Os receptores para o CRH são encontrados no hipotálamo, amígdala, hipocampo, locus coeruleus (LC), núcleo paraventricular, córtex pré-frontal e giro cingulado anterior. Funcionalmente, os sistemas CRH e LC parecem participar de uma regulação positiva, de modo que a ativação de um sistema tende a ativar o outro. Assim, a ativação do CRH também pode ativar os neurônios noradrenérgicos no LC resultando em ativação simpática mediada pelos receptores CRH-1¹⁴⁵.

A glândula adrenal (medula e córtex) representa outra área de integração entre o SNA e o eixo HPA. Modelos animais demonstraram que a função da glândula adrenal pode ser modulada tanto por estimulação somática nociceptiva quanto inócua¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Sato *et al*¹⁴⁷ verificaram que a estimulação do tipo acupuntura na pele da pata posterior de ratos anestesiados produziu aumento da secreção de catecolaminas pela glândula adrenal. E que atividade da adrenal foi eliminada com a remoção cirúrgica dos nervos aferentes que inervam a pata posterior.

Sato *et al.*¹⁴⁹ avaliaram os efeitos da movimentação articular do joelho saudável ou inflamado sobre atividade do nervo simpático adrenal em gatos anestesiados. Eles observaram que movimentos fisiológicos rítmicos de flexão ou extensão em joelhos saudáveis não alteraram a atividade do nervo simpático adrenal e nem a liberação de catecolaminas da adrenal. Por outro lado, nos joelhos agudamente inflamados (Caolina/carragenina) vários movimentos fisiológicos do joelho aumentaram atividade do nervo simpático adrenal e a liberação de catecolaminas da adrenal.

Tsuchiya *et al.*¹⁵⁰ estudaram os efeitos da estimulação cutânea sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona (glicocorticoide) em ratos anestesiados. Eles notaram que a estimulação mecânica nociceptiva, mas não toque inócua (escovação) bilateral da pata posterior por 10 min aumentou as concentrações plasmáticas de corticosterona. Assim, o fato da MAT ser realizada próxima a região

da incisão poderia também estimular indiretamente a região da operada provocando nocicepção e com isso a liberação de corticosterona.

Isso pode implicar no fato de que a resposta do SNA após uma estimulação somática (MAT) pode influenciar a atividade da glândula adrenal e isso, por sua vez, pode resultar na liberação de catecolaminas, como epinefrina, e glicocorticoides. Embora a evidência da TM na função endócrina em humanos ainda seja contraditória^{151,152}, é razoável propor que a estimulação somática (MAT) possa resultar em alterações na função do eixo HPA modulado via SNA.

Com base nos dados apresentados aqui, sugere-se a MAT possa estimular a liberação de mediadores pró-resolutivos que ativam o receptor FPR2/ALX, que por meio deste, leva a redução da hiperalgesia mecânica. Com a demonstração do envolvimento do receptor FPR2/ALX no efeito da MAT justifica-se a possibilidade de associar técnicas de TM com abordagens nutricionais (suplementação de ômega) para aumentar a efetividade do tratamento da dor pós-operatória. No entanto, pelo fato da MAT reduzir a hiperalgesia mecânica via receptor FPR2/ALX, mas não diminuir o edema ou a temperatura da pata, fica o questionamento do por que a ativação do receptor FPR2/ALX (com função pró-resolutiva) pela MAT não alterou os parâmetros inflamatórios. Assim, futuras pesquisas utilizando diferentes modelos de dor e inflamação com diferentes mensurações da inflamação, como análise da infiltração tecidual de neutrófilos ou o perfil da polarização de macrófagos, talvez possam esclarecer essa questão.

6. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia aplicada e os resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir:

- 1) O tratamento dos animais com BML-111 apresenta efeito anti-hiperalgésico dose dependente tanto no tratamento agudo quanto no tratamento diário.
- 2) A velocidade de aplicação da técnica da MAT tem interferência clara, onde somente a MATL produz efeito anti-hiperalgésico.
- 3) Os tratamentos diários com BML-111 e com a MATL não produzem efeitos significativos na redução do edema da pata no modelo pós-operatório.
- 4) Na fase inicial da inflamação, o tratamento com a MAT aumenta a temperatura da pata, sendo que na fase intermediária, tanto os tratamentos com a MAT quanto com o BML-111 promovem a redução da temperatura da pata e na fase tardia somente o tratamento com BML-111 induz a redução da temperatura na pata
- 5) A MAT é efetiva em reduzir a hiperalgesia mecânica em um modelo animal de dor pós-operatória e esse efeito é mediado, pelo menos em parte, por receptores FPR2/ALX periféricos e espinais.

Pode-se então inferir, que em um modelo animal de dor pós-operatória, o modo de aplicação da MAT é fator crucial na obtenção dos resultados esperados sobre a hiperalgesia mecânica sendo que a MAT lenta, mas não a MAT rápida, produz estes resultados, e que o efeito é mediado, pelo menos em parte, pela ativação do receptor FPR2/ALX tanto na periferia quando na medula espinal.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir deste trabalho, pretende-se fazer análises mais detalhadas sobre o efeito da MAT nas concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias bem como sobre a expressão do receptor FPR2/ALX tanto no tratamento com a MAT e com o BML-111. Em longo prazo, verificar no modelo de dor pós-operatória a participação de alguns mediadores pró-resolutivos especializados como a LXA₄ e as resolvinas.

7. REFERÊNCIAS

1. Feizerfan A, Sheh G. Transition from acute to chronic pain. *Contin Educ Anaesthesia, Crit Care Pain*. 2015;15(2):98–102.
2. Mifflin KA, Kerr BJ. The transition from acute to chronic pain: Understanding how different biological systems interact. *Can J Anesth*. 2014;61(2):112–22.
3. Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiol Clin North America*. 2005;23(1):1–20.
4. Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK, Brennan TJ. Postoperative pain--clinical implications of basic research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2007 Mar;21(1):3–13.
5. Apfelbaum JL, Chen C, Mehta SS, Gan TJ. Postoperative Pain Experience: Results from a National Survey Suggest Postoperative Pain Continues to Be Undermanaged. *Anesth Analg*. 2003;97(2):534–40, table of contents.
6. Macrae WA. Chronic post-surgical pain: 10 Years on. *Br J Anaesth*. 2008;101(1):77–86.
7. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;advance on(8):551–67.
8. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*. 2000;192(8):1197–204.
9. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014 Jun;510(7503):92–101.
10. Bena S, Brancaleone V, Wang JM, Perretti M, Flower RJ. Annexin A1 interaction with the FPR2/ALX receptor: Identification of distinct domains and downstream associated signaling. *J Biol Chem*. 2012;287(29):24690–7.
11. Pei L, Zhang J, Zhao F, Su T, Wei H, Tian J, et al. Annexin 1 exerts anti-nociceptive effects after peripheral inflammatory pain through formyl-peptide-

- receptor-like 1 in rat dorsal root ganglion. *Br J Anaesth.* 2011;107(6):948–58.
12. Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin V V., Serhan CN. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(11):6972–8.
 13. Norling L V, Spite M, Yang R, Flower RJ, Perretti M, Serhan CN. Humanized nano pro-resolving medicines mimic inflammation- resolution and enhance wound healing.
 14. Cholkar K, Trinh H, Vadlapudi A, Wang Z, Pal D, Mitra A. Interaction studies of Resolvin E1 Analog (RX-10045) with Efflux Transporters. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015;(31):248–55.
 15. Souza P, Norling L V. Implications for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid-derived resolvins as therapeutic for arthritis. *Eur J Pharmacol.* 2015;
 16. Sluka K, Wright A. Knee joint mobilization reduces secondary mechanical hyperalgesia induced by capsaicin injection into the ankle joint. *Eur J Pain.* 2001;5:81–7.
 17. 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.* 2012 Aug 1;13(8):1049–58.
 18. McKeon PO, Wikstrom EA. Sensory-targeted ankle rehabilitation strategies for chronic ankle instability. *Med Sci Sports Exerc.* 2016;48(5):776–84.
 19. Ahn EJ, Choi GJ, Kang H, Baek CW, Jung YH, Woo YC, et al. Antinociceptive Effects of Ginsenoside Rg3 in a Rat Model of Incisional Pain Ahn et al.: Antinociceptive Effects of Ginsenoside Rg3 in a Rat Model of Incisional Pain. *Eur Surg Res.* 2016;5757.
 20. Warner E, Krivitsky R, Cone K, Atherton P, Pitre T, Lanpher J, et al. Evaluation of a Postoperative Pain-Like State on Motivated Behavior in Rats: Effects of Plantar Incision on Progressive-Ratio Food-Maintained Responding. *Drug Dev Res.* 2015;
 21. 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.

22. Martins DF, Mazzardo-Martins L, Cidral-Filho FJ, Gadotti VM, Santos ARS. Peripheral and spinal activation of cannabinoid receptors by joint mobilization alleviates postoperative pain in mice. *Neuroscience*. 2013;255:110–21.
23. Berrueta L, Muskaj I, Olenich S, Butler T, Badger GJ, Colas RA, et al. Stretching Impacts Inflammation Resolution in Connective Tissue. *J Cell Physiol*. 2016;
24. HAS. HAS - Chirurgie ambulatoire en orthopédie [Internet]. 2014 [cited 2017 May 9]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1773302/fr/chirurgie-ambulatoire-en-orthopedie
25. Gerbershagen HJ, Aduckathil S, van Wijck AJM, Peelen LM, Kalkman CJ, Meissner W. Pain Intensity on the First Day after Surgery. *Anesthesiology*. 2013;118(4):934–44.
26. Chapman CR, Vierck CJ, Aasvang EK, Gmaehle E, Hansen JB, Gmaehle B, et al. The Transition of Acute Postoperative Pain to Chronic Pain: An Integrative Overview of Research on Mechanisms. *J Pain*. 2016;0(0):957–69.
27. Farr J, Jagers R, Lewis H, Plackis A, Sim SB, Sherman SL. Evidence-Based Approach of Treatment Options for Postoperative Knee Pain. *Phys Sportsmed*. 2014;
28. Gerbershagen HJ P-ZE. Risk Factors for Severe Postoperative Pain. *Anesthesiology*. 2014;120:1237–45.
29. Pogatzki EM, Raja SN. A Mouse Model of Incisional Pain Materials and Methods. *Anesthesiology*. 2003;99:1023–7.
30. Kawamata M, Watanabe H, Nishikawa K, Takahashi T, Kozuka Y, Kawamata T, et al. Different mechanisms of development and maintenance of experimental incision-induced hyperalgesia in human skin. *Anesthesiology*. 2002;97(3):550–9.
31. Su Y, Lim ECW. Does Evidence Support the Use of Neural Tissue Management to Reduce Pain and Disability in Nerve-related Chronic Musculoskeletal Pain? A Systematic Review with Meta-analysis. *The Clinical Journal of Pain*. 2015. 1 p.
32. Rao PNP, Knaus EE. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *J Pharm Pharm Sci* (www.cspsCanada.org). 2008;11(2):81–110.
33. Furlan AD, Sandoval JA, Mailis-Gagnon A, Tunks E. Opioids for chronic

- noncancer pain: A meta-analysis of effectiveness and side effects. *CMAJ*. 2006.
34. Analgesic Efficacy of Firocoxib, a Selective Inhibitor of Cyclooxygenase 2, in a Mouse Model of Incisional Pain. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(4):405–10.
 35. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996;
 36. Fitzgerald M. The spread of sensitization of polymodal nociceptors in the rabbit from nearby injury and by antidromic nerve stimulation. *J Physiol*. 1979;
 37. Campbell JN, Khan AA, Meyer RA, Raja SN. Responses to heat of C-fiber nociceptors in monkey are altered by injury in the receptive field but not by adjacent injury. *Pain*. 1988;
 38. Amirmohseni S, Segelcke D, Reichl S, Wachsmuth L, G??rlich D, Faber C, et al. Characterization of incisional and inflammatory pain in rats using functional tools of MRI. *Neuroimage*. 2016;
 39. Hsu SF, Zeng YJ, Tsai SY, Chen KB, Chen JYR, Chang JH, et al. Spinal p38 activity and analgesic effect after low- and high-intensity electroacupuncture stimulation in a plantar incision rat model. *Life Sci*. 2015;128:15–23.
 40. Pereira FC, Parisi JR, Maglioni CB, Machado GB, Barragán-Iglesias P, Silva JRT, et al. Antinociceptive effects of low-level laser therapy at 3 and 8 j/cm² in a rat model of postoperative pain: possible role of endogenous Opioids. *Lasers Surg Med*. 2017;49(9):844–51.
 41. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;(8):551–67.
 42. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: An integrated view. *EMBO Molecular Medicine*. 2013.
 43. Headland SE, Norling L V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. Vol. 27, *Seminars in Immunology*. 2015. p. 149–60.
 44. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, Neill LAJO, et al. Resolution of inflammation : state of the art , definitions and terms. 2007;21(2):325–32.
 45. Crean D, Godson C. Specialised lipid mediators and their targets. Vol. 27, *Seminars in Immunology*. 2015. p. 169–76.
 46. Sordi R, Menezes de Lima Jr O, Assreuy J. Biossíntese e funções das lipoxinas na resolução da inflamação. *Publ UEPG Ciências Biol e da Saude*.

- 2012;18(1):7–13.
47. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2000;164(4):1663–7.
 48. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 May 1;8(5):349–61.
 49. Scannell M, Maderna P. Lipoxins and annexin-1: resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:1555–73.
 50. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349–61.
 51. Dufton N, Perretti M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacol Ther*. 2010;127(2):175–88.
 52. Chiang N. The Lipoxin Receptor ALX: Potent Ligand-Specific and Stereoselective Actions in Vivo. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):463–87.
 53. Svensson CI, Zattoni M, Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. *J Exp Med*. 2007;204(2):245–52.
 54. Solito E, de Coupade C, Parente L, Flower RJ, Russo-Marie F. Human annexin 1 is highly expressed during the differentiation of the epithelial cell line A 549: involvement of nuclear factor interleukin 6 in phorbol ester induction of annexin 1. *Cell Growth Differ*. 1998;9(4):327–36.
 55. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(2007):62–70.
 56. Weksler Egle Solito BB, Romero IA, Marullo S, Solito E, Russo-Marie F, Weksler BB. Integrin 1 β 4 α Endothelium: Involvement of the Inhibits Their Adhesion to Microvascular Annexin 1 Binds to U937 Monocytic Cells and Annexin 1 Binds to U937 Monocytic Cells and Inhibits Their Adhesion to Microvascular Endothelium: Involvement of the β 4 α . *J Immunol Ref*. 2000;165:1573–81.
 57. Reikeras O, Borgen P, Reseland JE, Lyngstadaas SP. Changes in serum cytokines in response to musculoskeletal surgical trauma. *BMC Res Notes*. 2014;7:1–5.

58. Viegas VN, Emir M, Abreu R, Viezzer C, Machado DC, Sant ' M, et al. Effect of Low-Level Laser Therapy on Inflammatory Reactions during Wound Healing: Comparison with Meloxicam. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(6):467–73.
59. Pettman E. A history of manipulative therapy. *J Man Manip Ther.* 2007;15(3):165–74.
60. Huijbregts PA. Historical paper Orthopaedic Manual Physical Therapy- History , Development and Future Opportunities. 2010;11–24.
61. Fraser JJ, Corbett R, Donner C, Hertel J. Does manual therapy improve pain and function in patients with plantar fasciitis? A systematic review. *J Man Manip Ther.* 2017;9817(May):1–11.
62. Celik D, Kuş G, Sırma SÖ. Joint Mobilization and Stretching Exercise vs Steroid Injection in the Treatment of Plantar Fasciitis: A Randomized Controlled Study. *Foot ankle Int.* 2016 Feb 1;37(2):150–6.
63. Lucado AM, Dale RB, Vincent J, Day JM. Do joint mobilizations assist in the recovery of lateral elbow tendinopathy? A systematic review and meta-analysis. *J Hand Ther.* 2018;
64. Mirza Baig AA, Ahmed SI, Ali SS, Rehmani A, Siddiqui F. Role of posterior-anterior vertebral mobilization versus thermotherapy in non specific lower back pain. *Pakistan J Med Sci.* 2018 Apr 5;34(2).
65. Villeneuve P, Ceci LA, Parreira RB, Gulogurski Ribeiro L, Hosni AP, Paulo M, et al. Analysis of the NPT effect in women with chronic LBP: a pilot study. *Man Ther Posturology Rehabil J.* 2017;(November):2236–5435.
66. Kosik KB, Gribble PA. The Effect of Joint Mobilization on Dynamic Postural Control in Patients with Chronic Ankle Instability: A Critically Appraised Topic. *J Sport Rehabil.* 2016;1–15.
67. Espí-López G V., López-Martínez S, Inglés M, Serra-Añó P, Aguilar-Rodríguez M. Effect of manual therapy versus proprioceptive neuromuscular facilitation in dynamic balance, mobility and flexibility in field hockey players. A randomized controlled trial. *Phys Ther Sport.* 2018;32:173–9.
68. Rice AD, Patterson K, Reed ED, Wurn BF, Robles K, Klingenberg B, et al. Decreasing recurrent bowel obstructions, improving quality of life with physiotherapy: Controlled study. *World J Gastroenterol.* 2018;24(19):2108–19.
69. Espí-López G-V, Ruescas-Nicolau M-A, Nova-Redondo C, Benítez-Martínez JC, Dugailly P-M, Falla D. Effect of Soft Tissue Techniques on Headache

- Impact, Disability, and Quality of Life in Migraine Sufferers: A Pilot Study. *J Altern Complement Med.* 2018;0(0):acm.2018.0048.
70. Vigotsky AD, Bruhns RP. The role of descending modulation in manual therapy and its analgesic Implications: A Narrative Review. Vol. 2015, *Pain Research and Treatment.* 2015.
 71. Shashua A, Flechter S, Avidan L. The Effect of Additional Ankle and Midfoot Mobilizations on Plantar Fasciitis: A Randomized Controlled Trial. *J Orthop Sport Phys Ther.* 2015 Apr;45(4):265–72.
 72. 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.* 2010;14(5):531–8.
 73. Gál J, Herzog W, Kawchuk G, Conway PJ, Zhang YT. Movements of vertebrae during manipulative thrusts to unembalmed human cadavers. *J Manipulative Physiol Ther.* 1997 Jan;20(1):30–40.
 74. Coppieters MW, Butler DS. Do “sliders” slide and “tensioners” tension? An analysis of neurodynamic techniques and considerations regarding their application. *Man Ther.* 2008;13(3):213–21.
 75. Colloca CJ, Keller TS, Harrison DE, Moore RJ, Gunzburg R, Harrison DD. Spinal manipulation force and duration affect vertebral movement and neuromuscular responses. *Clin Biomech.* 2006;21(3):254–62.
 76. Coppieters MW, Alshami AM. Longitudinal excursion and strain in the median nerve during novel nerve gliding exercises for carpal tunnel syndrome. *J Orthop Res.* 2007 Jul;25(7):972–80.
 77. Tullberg T, Blomberg S, Branth B, Johnsson R. Manipulation does not alter the position of the sacroiliac joint. A roentgen stereophotogrammetric analysis. *Spine (Phila Pa 1976).* 1998 May 15;23(10):1124–8; discussion 1129.
 78. Hsieh CY, Vicenzino B, Yang CH, Hu MH, Yang C. Mulligan’s mobilization with movement for the thumb: A single case report using magnetic resonance imaging to evaluate the positional fault hypothesis. *Man Ther.* 2002;7(1):44–9.
 79. Troyanovich SJ, Harrison DD, Harrison DE. Motion palpation: it’s time to accept the evidence. *J Manipulative Physiol Ther.* 1998 Oct;21(8):568–71.
 80. Seffinger MA, Najm WI, Mishra SI, Adams A, Dickerson VM, Murphy LS, et al. Reliability of spinal palpation for diagnosis of back and neck pain: a systematic review of the literature. *Spine (Phila Pa 1976).* 2004 Oct 1;29(19):E413-25.

81. Cleland JA, Childs MJD, McRae M, Palmer JA, Stowell T. Immediate effects of thoracic manipulation in patients with neck pain: A randomized clinical trial. *Man Ther.* 2005;10(2):127–35.
82. Cleland JA, Childs JD, Fritz JM, Whitman JM, Eberhart SL. Development of a Clinical Prediction Rule for Guiding Treatment of a Subgroup of Patients With Neck Pain: Use of Thoracic Spine Manipulation, Exercise, and Patient Education. *Phys Ther.* 2007;87(1):9–23.
83. Vicenzino B, Collins D, Wright A. The initial effects of a cervical spine manipulative physiotherapy treatment on the pain and dysfunction of lateral epicondylalgia. *Pain.* 1996 Nov;68(1):69–74.
84. Motealleh A, Gheysari E, Shokri E, Sobhani S. The immediate effect of lumbopelvic manipulation on EMG of vasti and gluteus medius in athletes with patellofemoral pain syndrome: A randomized controlled trial. *Man Ther.* 2016;22:16–21.
85. DeVocht JW, Pickar JG, Wilder DG. Spinal manipulation alters electromyographic activity of paraspinal muscles: A descriptive study. *J Manipulative Physiol Ther.* 2005;28(7):465–71.
86. Suter E, McMorland G, Herzog W, Bray R. Decrease in quadriceps inhibition after sacroiliac joint manipulation in patients with anterior knee pain. *J Manipulative Physiol Ther.* 1999;22(3):149–53.
87. Suter E, McMorland G. Decrease in elbow flexor inhibition after cervical spine manipulation in patients with chronic neck pain. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2002 Aug;17(7):541–4.
88. McLean S, Naish R, Reed L, Urry S, Vicenzino B. A pilot study of the manual force levels required to produce manipulation induced hypoalgesia. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2002 May;17(4):304–8.
89. 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.* 2009;
90. Lunghi C, Tozzi P, Fusco G. The biomechanical model in manual therapy: Is there an ongoing crisis or just the need to revise the underlying concept and application? *J Bodyw Mov Ther.* 2016;20(4):784–99.
91. Martins D. Análise dos mecanismos neurofisiológicos envolvidos no efeito da terapia manual (mobilização articular) na dor aguda e crônica. 2013.

92. Teodorczyk-Injeyan JA, Injeyan HS, Ruegg R. Spinal manipulative therapy reduces inflammatory cytokines but not substance P production in normal subjects. *J Manipulative Physiol Ther.* 2006;29(1):14–21.
93. Degenhardt BF, Darmani N a, Johnson JC, Towns LC, Rhodes DCJ, Trinh C, et al. Role of osteopathic manipulative treatment in altering pain biomarkers: a pilot study. *J Am Osteopath Assoc.* 2007;107(9):387–400.
94. McPartland JM, Giuffrida A, King J, Skinner E, Scotter J, Musty RE. Cannabimimetic effects of osteopathic manipulative treatment. *J Am Osteopath Assoc.* 2005;105(6):283–91.
95. Malisza KL, Stroman PW, Turner A, Gregorash L, Foniok T, Wright A. Functional MRI of the rat lumbar spinal cord involving painful stimulation and the effect of peripheral joint mobilization. In: *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 2003.
96. Linker B. The Great War and Modern Health Care. *N Engl J Med.* 2016;374(20):1907–9.
97. Hammer W. Exame Funcional dos Tecidos Moles e Tratamento por Métodos Manuais. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. 544 p.
98. Maitland GD. Maitland's peripheral manipulation E-book. 5th ed. Hengeveld E, Banks K, editors. Churchill Livingstone; 2014. 576 p.
99. Maitland GD. the Treatment of Joints By Passive Movement. *Aust J Physiother.* 1973;19(2):65–72.
100. Zimny ML. Mechanoreceptors in articular tissues. *Am J Anat.* 1988;182(1):16–32.
101. Do Moon G, Lim JY, Kim DY, Kim TH. Comparison of Maitland and Kaltenborn mobilization techniques for improving shoulder pain and range of motion in frozen shoulders. *J Phys Ther Sci.* 2015;27(5):1391–5.
102. Estébanez-de-Miguel E, Agud MF, del- Barrio SJ, Caudevilla-Polo S, Bueno-Gracia E, Tricás-Moreno JM. Comparison of high, medium and low mobilization forces for increasing range of motion in patients with hip osteoarthritis: A randomized controlled trial. *Musculoskelet Sci Pract.* 2018;
103. DELAHUNT E, CUSACK K, WILSON L, DOHERTY C. Joint Mobilization Acutely Improves Landing Kinematics in Chronic Ankle Instability. *Med Sci Sport Exerc.* 2013 Mar;45(3):514–9.
104. Fisher BE, Piraino A, Lee Y-Y, Smith JA, Johnson S, Davenport TE, et al. The

- Effect of Velocity of Joint Mobilization on Corticospinal Excitability in Individuals With a History of Ankle Sprain. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2016 Jul;46(7):562–70.
105. Courtney CA, Steffen AD, Fernández-de-las-Peñas C, Kim J, Chmell SJ. Joint Mobilization Enhances Mechanisms of Conditioned Pain Modulation in Individuals With Osteoarthritis of the Knee. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2016 Mar;46(3):1–30.
106. Paungmali A, O'Leary S, Souvlis T, Vicenzino B. Naloxone fails to antagonize initial hypoalgesic effect of a manual therapy treatment for lateral epicondylalgia. *J Manipulative Physiol Ther.* 2004;27(3):180–5.
107. Courtney CA, Witte PO, Chmell SJ, Hornby TG. Heightened Flexor Withdrawal Response in Individuals With Knee Osteoarthritis Is Modulated by Joint Compression and Joint Mobilization. *J Pain.* 2010;11(2):179–85.
108. Machelska H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides.* 2007;41(6):355–63.
109. Martins DF, Mazzardo-Martins L, Gadotti VM, Nascimento FP, Lima DAN, Speckhann B, et al. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. *Pain.* 2011 Nov;152(11):2653–61.
110. Loggia ML, Chonde DB, Akeju O, Arabasz G, Catana C, Edwards RR, et al. Evidence for brain glial activation in chronic pain patients. *Brain.* 2015;138(3):604–15.
111. Romero A, Romero-Alejo E, Vasconcelos N, Puig MM. Glial cell activation in the spinal cord and dorsal root ganglia induced by surgery in mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;702(1–3):126–34.
112. Bortalanza LB, Ferreira J, Hess SC, Delle Monache F, Yunes RA, Calixto JB. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur J Pharmacol.* 2002;453(2–3):203–8.
113. Martins DF, Brito RN, 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. *J Neurosci Res.* 2015;93(1):157–66.
114. Erthal V, Maria-Ferreira D, de Paula Werner MF, Baggio CH, Nohama P. Anti-

- inflammatory effect of laser acupuncture in ST36 (Zusanli) acupoint in mouse paw edema. *Lasers Med Sci.* 2016;31(2):315–22.
115. Piovezan AP, Batisti AP, Benevides MLACS, Turnes BL, Martins DF, Kanis L, et al. Hydroalcoholic crude extract of *Casearia sylvestris* Sw. reduces chronic post-ischemic pain by activation of pro-resolving pathways. *J Ethnopharmacol.* 2017;
 116. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16(2):109–10.
 117. Wu CL, Raja SN. Treatment of acute postoperative pain. *Lancet.* 2011;377(9784):2215–25.
 118. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014;510(7503):92–101.
 119. Patel BK, Hall JB. Perioperative physiotherapy. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2013 Apr;26(2):152–6.
 120. Brennan TJ. Pathophysiology of postoperative pain. *Pain.* 2011 Mar;152(Supplement):S33–40.
 121. Srikandarajah S, Gilron I. Systematic review of movement-evoked pain versus pain at rest in postsurgical clinical trials and meta-analyses: A fundamental distinction requiring standardized measurement. *Pain.* 2011;152(8):1734–9.
 122. Kahanov L, Kato M. Therapeutic Effect of Joint Mobilization: Joint Mechanoreceptors and Nociceptors. *Athl Ther today.* 2007;12(4):28–31.
 123. Licciardone JC, Kearns CM, Hodge LM, Bergamini MVW. Associations of cytokine concentrations with key osteopathic lesions and clinical outcomes in patients with nonspecific chronic low back pain: results from the OSTEOPATHIC Trial. *J Am Osteopath Assoc.* 2012;112(9):596–605.
 124. Zein-Hammoud M, Standley PR. Modeled Osteopathic Manipulative Treatments: A Review of Their in Vitro Effects on Fibroblast Tissue Preparations. *J Am Osteopath Assoc.* 2015;115(8):490.
 125. Meltzer KR, Standley PR. and Indirect Osteopathic Manipulative Techniques in Regulation of Human Fibroblast Proliferation and Interleukin Secretion. 2007;107(12):527–36.
 126. Migeotte I, Communi D, Parmentier M. Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 2006.

127. Sinniah A, Yazid S, Perretti M, Solito E, Flower RJ. The role of the Annexin-A1/FPR2 system in the regulation of mast cell degranulation provoked by compound 48/80 and in the inhibitory action of nedocromil. *Int Immunopharmacol.* 2016;32:87–95.
128. Carreira EU, Carregaro V, Teixeira MM, Moriconi A, Aramini A, Verri WA, et al. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. *Eur J Pain (United Kingdom).* 2013;17(5):654–63.
129. Rittner HL. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *J Leukoc Biol.* 2005;78(6):1215–22.
130. Sahbaie P, Li X, Shi X, Clark JD. Roles of Gr-1+ Leukocytes in Postincisional Nociceptive Sensitization and Inflammation. *Anesthesiology.* 2012 Sep;117(3):602–12.
131. Rittner HL, Mousa SA, Labuz D, Beschmann K, Scha M, Stein C, et al. Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2 / 3 injection does not cause inflammatory pain examine selective PMN recruitment or did not doxycycline-induced PMN selective recruitment and is. *Animals.* 2006;79(5):1022–32.
132. Oliveira SM, Drewes CC, Silva CR, Trevisan G, Boschen SL, Moreira CG, et al. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. *Eur J Pharmacol.* 2011;672(1–3):88–95.
133. Yasuda M, Kido K, Ohtani N, Masaki E. Mast cell stabilization promotes antinociceptive effects in a mouse model of postoperative pain. *J Pain Res.* 2013;6:161–6.
134. Ji R-R, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain.* 2013 Dec;154(0 1):S10–28.
135. Sato KL, Johane LM, Sanada LS, Sluka KA. Spinal cord stimulation reduces mechanical hyperalgesia and glial cell activation in animals with neuropathic pain. *Anesth Analg.* 2014;118(2):464–72.
136. Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M, DeLeo JA. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1beta expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res.* 1999 May 22;829(1–2):209–21.
137. Watkins LR, Martin D, Ulrich P, Tracey KJ, Maier SF. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia

- in the rat. *Pain*. 1997 Jul;71(3):225–35.
138. Alkaitis MS, Solorzano C, Landry RP, Piomelli D, Deleo JA, Romero-Sandoval EA. Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain. *PLoS One*. 2010;5(5).
 139. Sun T, Yu E, Yu L, Luo J, Li H, Fu Z. LipoxinA4 induced antinociception and decreased expression of NF-kB and pro-inflammatory cytokines after chronic dorsal root ganglia compression in rats. *Eur J Pain*. 2012;16:18–27.
 140. Hu S, Mao-Ying QL, Wang J, Wang ZF, Mi WL, Wang XW, et al. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin alleviate bone cancer pain in association with suppressing expression of spinal proinflammatory cytokines. *J Neuroinflammation*. 2012;9(1):1.
 141. Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med*. 2010;16(5):592–7.
 142. Huang L, Wang CF, Serhan CN, Strichartz G. Enduring prevention and transient reduction of postoperative pain by intrathecal resolvin D1. *Pain*. 2011;152(3):557–65.
 143. Cirino G, Cicala C, Sorrentino L, Ciliberto G, Arpaia G, Perretti M, et al. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. *Br J Pharmacol*. 1993;108(3):573–4.
 144. Kovanur Sampath K, Mani R, Cotter JD, Tumilty S. Measureable changes in the neuro-endocrinal mechanism following spinal manipulation. *Med Hypotheses*. 2015;85(6):819–24.
 145. Lenders JW, Golczynska A, Goldstein DS. Glucocorticoids, sympathetic activity, and presynaptic alpha 2-adrenoceptor function in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Jun;80(6):1804–8.
 146. Budgell B, Sato A. Chapter 29. Modulations of autonomic functions by somatic nociceptive inputs. In: *The Polymodal Pathological Pain Receptor—A Gateway to Pathological Pain*. 1996. p. 525–39.
 147. Sato A, Sato Y, Suzuki A, Uchida S. Reflex modulation of catecholamine secretion and adrenal sympathetic nerve activity by acupuncture-like stimulation in anesthetized rat. *Jpn J Physiol*. 1996 Oct;46(5):411–21.
 148. Kimura A, Sato A. Somatic regulation of autonomic functions in anesthetized animals--neural mechanisms of physical therapy including acupuncture. *Jpn J*

- Vet Res. 1997 Nov;45(3):137–45.
149. Sato A, Sato Y, Schmidt RF. Catecholamine secretion and adrenal nerve activity in response to movements of normal and inflamed knee joints in cats. *J Physiol.* 1986;375(1):611–24.
 150. Tsuchiya T, Nakayama Y, Sato A. Somatic afferent regulation of plasma corticosterone in anesthetized rats. *Jpn J Physiol.* 1991;41(1):169–76.
 151. Whelan TL, Dishman JD, Burke J, Levine S, Sciotti V. The effect of chiropractic manipulation on salivary cortisol levels. *J Manipulative Physiol Ther.* 2002;25(3):149–53.
 152. Plaza-Manzano G, Molina-Ortega F, Lomas-Vega R, Martínez-Amat A, Achalandabaso A, Hita-Contreras F. Changes in Biochemical Markers of Pain Perception and Stress Response After Spinal Manipulation. *J Orthop Sport Phys Ther.* 2014;44(4):231–9.
 153. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014 Jun 4;510(7503):92–101.
 154. Pei L, Zhang J, Zhao F, Su T, Wei H, Tian J, et al. Annexin 1 exerts anti-nociceptive effects after peripheral inflammatory pain through formyl-peptide-receptor-like 1 in rat dorsal root ganglion. *Br J Anaesth.* 2011;
 155. Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK, Brennan TJ. Postoperative pain - clinical implications of basic research. *Best Pr Res Clin Anaesthesiol.* 2007;(21):3–13.

ANEXO

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 13 de junho de 2017
Registro na CEUA (código):17.009.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

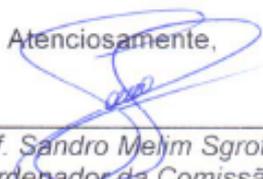
Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do efeito anti-hiperalgésico da terapia manual na dor pós-operatória em camundongos: análise de um possível papel pró-resolutivo", registrada com o nº17.009.2.07.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 14/06/2017.

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 Meijm Sgrott
Coordenador da Comissão

