

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE LARISSA MILANI BROGNOLI SINHORIM

REORGANIZAÇÃO MIOFASCIAL DA FASCIA TORACOLOMBAR REDUZ HIPERALGESIA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES OPIOIDE E CANABINOIDE EM CAMUNDONGOS COM INFLAMAÇÃO NA PATA

Palhoça 2022

LARISSA MILANI BROGNOLI SINHORIM

REORGANIZAÇÃO MIOFASCIAL DA FASCIA TORACOLOMBAR REDUZ HIPERALGESIA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES OPIOIDE E CANABINOIDE EM CAMUNDONGOS COM INFLAMAÇÃO NA PATA

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr. Coorientadores: Verônica Horewicz, Dra. / Prof. Robert Schleip, Dr.

> Palhoça 2022

LARISSA MILANI BROGNOLI SINHORIM

REORGANIZAÇÃO MIOFASCIAL DA FASCIA TORACOLOMBAR REDUZ HIPERALGESIA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES OPIOIDE E CANABINOIDE EM CAMUNDONGOS COM INFLAMAÇÃO NA PATA

Esta tese foi julgada adequada pelo programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Palhoça (SC), 18 de novembro de 2022.

Daniel F. Wlantins.

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - UNISUL

Profa. Anna Paula Piovezan, Dra.

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - UNISUL

Profa. Josiane Somariva Prophiro, Dra.

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - UNISUL

gros.

Prof. Gilmar Moraes Santos, Dr.

Programa de Pós-Graduação Ciências do Movimento Humano - UDESC

Programa de Pós Gladuação em Fisioterapia - UDESC

Prof. Afonso Shiguemi Inoue Salgado, Dr. Natural Quanta, EUA

S62

Sinhorim, Larissa, 1982 -

Reorganização miofascial da fascia toracolombar reduz hiperalgesia por meio da ativação de receptores opioide e canabinoide em camundongos com inflamação na pata / Larissa Sinhorim. – 2022.

145 f. : il. color. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pósgraduação em Ciências da Saúde. Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins Coorientação: Profa. Dra. Verônica Horewicz Coorientação: Prof. Dr. Robert Schleip

1. Inflamação – Tratamento. 2. Dor - Tratamento. 3. Animais -Experimentação. 4. Fáscia (Anatomia). 5. Terapia manual. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Horewicz, Verônica. III. Schleip, Robert. IV. Universidade do Sul de Santa Catarina. V. Título.

CDD (21. ed.) 616.0473

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215

Dedicatória

-

Ao amor da minha vida, meu marido Luiz Alberto Sinhorim. Nos seus braços ri e chorei durante esses 10 anos de pósgraduação.

AGRADECIMENTOS

A Deus!

Por Ele foi dada a permissão para o recebimento da RMF, de vivenciar todos os momentos, experienciar todos os laços afetivos, aprimorar e agregar em meu coração e espírito memórias EXTRAORDINÁRIAS.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço pela oportunidade da taxa que possibilitou a realização deste trabalho, assim como ao PPGCS e a UNISUL.

Quanto mais estudo, mais me rendo a conexão divina que nos rege – LS

i

RESUMO

Introdução: Fisioterapeutas usam intervenções manuais direcionadas ao sistema fascial para tratar disfunção musculoesquelética e dor, mas o papel dos mecanismos endógenos do efeito analgésico não tem sido investigado.

Objetivo: Avaliar o papel dos receptores opioide e canabinoide no efeito antihiperalgésico produzido pela reorganização miofascial (RMF) aplicada na fáscia toracolombar (FTL) em modelo animal de inflamação persistente na pata.

Métodos: Estudo experimental (CEUA - Registro n° 19.049.2.07.IV). Inflamação periférica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) do Adjuvante Completo de *Freund* (CFA) a 50% em camundongos. Utilizou-se a RMF na FTL por 5, 10 ou 20 min. Frequência de retirada da pata ao estímulo mecânico, edema e o fibroblasto, foram avaliados. Participação do sistema nervoso periférico avaliado utilizando lidocaína lintrafascial), e receptores opioide e canabinoide avaliados pela administração periférica (intrafascial e intraplantar) e central (intratecal) de naloxona e AM630, respectivamente, em 24 h e 96 h após CFA. Concentração de interleucina (IL), IL-1β, IL-6 e IL-10 foram determinadas por Ensaio de imunoabsorção enzimática. O imunoconteúdo dos receptores CB₂ e opioide-µ foram identificados por por meio da técnica de *Western Blotting*. Foram adotados valores de p < 0,05.

Resultados: RMF reduziu a hiperalgesia mecânica, mas não o edema. A redução da hiperalgesia foi prevenida pelo pré-tratamento com naloxona e AM630 por todas as vias administradas. Não houve alteração das citocinas analisadas. A técnica proposta ocasiona uma modulação dos receptores opioide-µ, CB₂ e ativa fibroblasto, todos na FTL. O tempo que resultou em melhor resultado anti-hiperalgésico foi 10 min.

Conclusão: Em conjunto, foi demonstrado o envolvimento dos receptores opioide e canabinoide no efeito anti-hiperalgésico da RMF em um modelo animal de dor. Assim, fornece-se uma possível base mecanicista da ação dessa técnica de terapia manual para o alívio da dor nociceptiva de origem inflamatória.

Descritores: Dor inflamatória (CFA), Experimentação animal, Fáscia, Terapia manual.

ABSTRACT

Introduction: Physiotherapists use manual interventions targeting the fascial system to treat musculoskeletal dysfunction and pain, but the role of endogenous mechanisms of analgesic effect has not been investigated.

Objective: To evaluate the role of opioid and cannabinoid receptors in the antihyperalgesic effect produced by myofascial reorganization (MR) applied to the thoracolumbar fascia (FTL) in an animal model of persistent paw inflammation.

Methods: Experimental study (CEUA - Registration No. 19.049.2.07.IV). Peripheral inflammation induced by intraplantar (i.pl.) injection of 50% Complete Freund's Adjuvant (CFA) in mice. RMF was used in FTL for 5, 10 or 20 min. Paw withdrawal frequency to mechanical stimulation, edema and fibroblast were evaluated. Peripheral nervous system involvement assessed using lidocaine (intrafascial), and opioid and cannabinoid receptors assessed by peripheral (intrafascial and intraplantar) and central (intrathecal) administration of naloxone and AM630, respectively, at 24 h and 96 h after CFA. Interleukin (IL), IL-1 β , IL-6 and IL-10 concentration were determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. The immunocontent of CB₂ and μ -opioid receptors were identified using the Western Blotting technique. Values of p < 0.05 were adopted.

Results: MR reduced mechanical hyperalgesia, but not edema. Reduction of hyperalgesia was prevented by pretreatment with naloxone and AM630 by all routes administered. There was no change in the analyzed cytokines. The proposed technique causes a modulation of μ -opioid, CB₂ and activates fibroblasts, all in the FTL. The time that resulted the best anti-hyperalgesic result was 10 min.

Conclusion: Together, the involvement of opioid and cannabinoid receptors in the antihyperalgesic effect of MR in an animal model of pain was demonstrated. Thus, a possible mechanistic basis of the action of this manual therapy technique for the relief of nociceptive pain of inflammatory origin is provided.

Descriptors: Inflammatory pain (CFA), Animal experimentation, Fascia, Manual therapy.

LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas

- RMF Reorganização miofascial
- NO Óxido nítrico (do inglês, nitric oxide)

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *Internacional Association for the Study of Pain*)

- TNF Fator de necrose tumoral (do inglês, Tumor necrosis factor)
- PGs Prostaglandinas
- NGF Fator de crescimento do nervo (do inglês, Nerve growth factor)
- Aδ A delta
- GSNE Gânglio sensorial do nervo espinal
- CPME Corno posterior da medula espinal
- SNP Sistema nervoso periférico
- SNC Sistema nervoso central
- SE Sistema canabinoide
- SO Sistema opioide
- ROs Receptores opioides
- μ Mu
- R-CB1 Receptor canabinoide 1
- R-CB₂ Receptor canabinoide 2
- AEA Anandamida (do inglês, Anandamide)
- 2-AG 2-araquidonoil-glicerol (do inglês, 2-arachidonoyl-glycerol)
- GPCR Receptor acoplado a proteína G (do inglês, G protein coupled receptor)
- MEC Matriz extracelular, (do inglês, extracellular matrix)
- ELISA Ensaio de imunoabsorção enzimática
- MFB Miofibroblastos
- SP Substância P
- CFA Adjuvante Completo de Freund (do inglês, Complete Freund's Adjuvant)
- MFS Manipulação do sistema fascial (do inglês, Manipulation of the Fascial System)

TGF-β1 – Fator de crescimento transformador beta 1 (do inglês, *Transforming Growth Factor-beta 1*)

- IL Interleucina
- i.f. Intrafascial

i.pl. - Intraplantar i.t. – Intratecal MIA – Morte indolor assistida Lista de quadros Lista de figuras Figura 1 – Resposta natural da inflamação......18 Figura 3 – Expressão de receptores opioides no neurônio sensorial periférico26 Figura 6 – Alteração conformacional da célula a partir de um estímulo mecênico....37 Figura 10 – Injeção de CFA.62 Figura 11 – Aplicação do protocolo de RMF adaptado para camundongos.64 Figura 12 – Avaliação da hiperalgesia mecânica......65 Figura 13 – Avaliação do edema da pata.....66

Lista de tabelas

Tabela 1 - Sumarização de estudos (pré-clínico, clínico e revisão sistemática) que
utilizaram como tratamento intervenção fascial47
Tabela 2 – Diferentes tempos de tratamentos para cada grupo
Tabela 3 - Avaliação do sistema nervoso periférico no efeito anti-hiperalgésico da
RMF via i.f
Tabela 4 – Efeito da RMF sobre edema59
Tabela 5 - Verificação do envolvimento do receptor opioide periférico e central no
efeito anti-hiperalgésico da RMF na região toracolombar, i.pl. ou i.t
Tabela 6 - Verificação do envolvimento do R-CB2 periférico e central no efeito anti-
hiperalgésico da RMF na região toracolombar, i.pl. ou i.t

Tabela 7 – Quantificação do imunoconteúdo dos receptores opioide e canabinoid	
60	
Tabela 8 – Determinação da quantificação de citocinas pró- e anti-inflamatórias61	
Tabela 9 – Análise histológica semiquantitativa. Amostras da região toracolombar e	
oata61	
Tabela 10 – Parâmetros de avaliação histológica semiquantitativamente69	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1.1 Inflamação	16
1.1.2 Modelos animais de dor inflamatória	20
1.1.3 Dor	21
1.1.4 Mecanismos endógenos de controle da dor	24
1.1.4.1 Sistema opioide	25
1.1.4.2 Sistema canabinoide	
1.1.5 Sistema fascial	
1.1.6 Tratamento à distância: Tensegridade e mecanotransdução	
1.1.7 Inervação sensorial da fáscia na região toracolombar	40
1.1.7.1 Receptores opioide e canabinoide na fáscia	
1.1.8 Manipulação do sistema fascial	43
2. OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL	
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
3. MÉTODOS	53
3.1 TIPO DO ESTUDO	53
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	53
3.3 ANIMAIS	55
3.3.1 Cálculo da amostra	
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	
3.4.1 Experimento 1 – Verificação dos diferentes tempos de tratamento)s 57
3.4.2 Experimento 2 – Avaliação do envolvimento do sistema	nervoso
perifério	
3.4.3 Experimento 3 – Analise do edema da pata	
3.4.4 Experimento 4 – Envolvimento dos receptores opioides peri	féricos e
centrais	
3.4.5 Experimento 5 – Envolvimento dos receptores canabinoides per	iféricos e
centrais	

3.4.6 Experimento 6 – Quantificação do imunoconteúdo do receptor o	opioide e
canabinoide	60
3.4.7 Experimento 7 e 8 – Quantificação de citocinas pró- e anti-inflamat	órias (IL-
1β, IL-6 e IL-10)	60
3.4.8 Analise histológica semiquantitativa	61
3.5 ENSAIOS, TESTES e TÉCNICAS	62
3.5.1 Modelo de inflamação persistente induzido pelo CFA	62
3.5.2 Tratamento com RMF	62
3.5.3 Avaliação hiperalgesia mecânica	64
3.5.4 Avaliação do edema da pata	65
3.5.5 Avaliação da participação dos receptores opioide e R-CB2 no ef	eito anti-
hiperalgésico induzido pela RMF	66
3.5.6 Avaliação do imunoconteúdo dos receptores opioide e can	abinoide
periféricos e centrais – <i>Western Blotting</i>	66
3.5.7 Determinação das concentrações das citocinas inflamatórias – E	LISA 68
3.5.8 Análise histológica semiquantitativa	68
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO	69
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	70
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	70
4. ARTIGOS	72
4.1 ARTIGO 1	73
4.1 ARTIGO 2	88
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
REFERÊNCIAS	137
ANEXO 1 – Parecer aprovação da CEUA	153
ANEXO 2 – Guia ARRIVE	155
ANEXO 3 – Produção científica durante período do doutoramento	

1. INTRODUÇÃO

Terapias manuais (TM) direcionadas ao sistema fascial crescem na reabilitação neuromusculoesquelética chamando atenção dos centros de pesquisas, principalmente para o tratamento da dor^{1–3}. Seus efeitos biomecânicos promissores oriundos da interação com propriedades viscoelásticas, remodelagem da matriz extracelular, produção de ácido hialurônico e melhora da oxigenação, já são bem conhecidos^{1,4-6}. Contudo, somente os mecanismos biomecânicos envolvidos na abordagem manual não explicam de maneira completa os efeitos observados na prática clínica. Neste sentido, acredita-se que a neurociência possa ajudar no avanço da compreensão do mecanismo adjacente a esses efeitos, havendo interesse tanto de cientistas que estudam os sistemas neurais envolvidos na mecanossensibilização, quanto de clínicos que as utilizam baseadas na mecanobiologia e mecanotransdução.

A busca para o alívio da dor é um campo ascendente em nível mundial, visto que a dor permanece há anos como a maior causa de incapacidade. Preocupados e com intuito de promover este campo emergente (Mecanismos neurais de TM baseadas na força), o Centro Nacional de Saúde Complementar e Integrativa (NCCIH) dos Estados Unidos da América lançou oportunidades de financiamento para apoiar o desenvolvimento de pesquisas em redes, para fomentar o avanço dessa área³. Uma das condições dolorosas mais comuns nos centros de reabilitação é a dor nociceptiva de origem inflamatória que envolve aumento da sinalização aferente conhecida como sensibilização periférica, aumento da transmissão da dor chamada de sensibilização central e percepção central da dor que envolve a integração e modulação da dor⁶. Durante a regulação da homeostase corporal, mecanismos endógenos modulam o processo inflamatório interferindo na dor. Os sistemas opioidérgico, adenosinérgico, canabinoidérgico entre outros, são agentes centrais nesse processo e já foi demonstrado experimentalmente o envolvimento deles na analgesia causada por técnicas manuais como a mobilização articular^{7–9}.

O conhecimento do funcionamento do sistema fascial pode contribuir para uma melhor compreensão e manejo dor nociceptiva de origem inflamatória⁹. A exemplo de outras estruturas do corpo, a fáscia também é inervada, sendo uma inervação com distribuição particular e localização precisa, constituída principalmente por proprioceptores e nociceptores, sendo estes últimos mais numerosos em situações

patológicas, denotando seu papel como fonte nociceptiva, principalmente a fáscia toracolombar (FTL)^{10,11}.

Dentre os sistemas de neurotransmissores envolvidos no controle da dor mais estudados e promissores estão os sistemas opioide e canabinoide. Recentemente, foi encontrado na FTL de seres humanos a expressão de receptores CB₁ e CB₂¹². No entanto, seu papel na modulação da dor e na manipulação da fáscia não tem sido ainda bem explorado. Além disso, o fibroblasto, principal célula do sistema fascial, quando estimulado mecanicamente, libera diversos mediadores antinociceptivo⁵. Neste contexto, esses sistemas presentes no sistema fascial podem se tornar potenciais alvos terapêuticos analgésicos.

Desta forma, compreender o mecanismo de ação da analgesia produzida pelas técnicas de TM pode fomentar ainda mais a utilização na prática clínica dessa solução com baixo custo e não farmacológica do tratamento da dor, sendo um campo promissor. O ineditismo desse estudo se caracteriza por utilizar uma intervenção manual com foco no sistema fascial, a reorganização miofascial (RMF), por meio de uma técnica direcionada a FTL adaptada para camundongos¹³ e aplicá-la no tratamento desses animais com inflamação na pata. Preconizando cargas de pressão específicas (tangencial sustentada, tração e cisalhamento) e o tratamento à distância, com base na mecanobiologia, mecanotrandução e biotensegridade^{13,14}. Esses, fatores primordiais das intervenções direcionadas ao sistema fascial.

No presente estudo, objetiva-se fornecer informações sobre tempo de tratamento, características inflamatórias e possíveis mecanismos envolvidos no controle da dor de origem inflamatória, realizada à distância do local de origem da inflamação. Ademais, pretende-se investigar a participação dos receptores opioide e canabinoide neste efeito. Produzindo suporte científico para a prática manual e abrindo caminho para futuros estudos clínicos a partir da ciência básica, proporcionando base neurofisiológica e, especialmente, desenvolver abordagens terapêuticas mais adequadas aos indivíduos que sofrem com essa condição tão limitadora que é a dor. Assim, mediante o exposto, a pergunta central desta pesquisa foi: "Quais são os efeitos da aplicação da técnica de RMF na hiperalgesia mecânica e inflamação e se há o envolvimento dos receptores opioide e canabinoide nesse efeito?"

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Para melhor interpretação das questões abordadas nesse estudo, uma revisão de literatura enfatizando esclarecer os tópicos centrais abordados foi elaborada: inflamação, dor e principais mecanismos endógenos no controle da dor (sistemas opioide e canabinoide) e seu envolvimento com o sistema fascial. Além de dissertar sobre o sistema fascial, incluindo tensegridade, mecanotransdução e intervenções direcionadas para esse sistema. Ao fim, sobre o modelo inflamatório de experimentação e a técnica de tratamento que foi utilizada.

Sobre o tópico, inervação sensorial da fáscia na região toracolombar foi produzido e já publicado no *Journal of Clinical Medicine* uma revisão de escopo intitulada: *Potential Nociceptive Role of the Thoracolumbar Fascia: A Scope Review Involving In Vivo and Ex Vivo Studies* (2021).

Para o desenvolvimento minucioso desse material, utilizou-se as principais bases de dados nos períodos: PubMed, LILACS, SciELO. Buscou-se suporte em revisões sistemáticas e meta-análises, revisões narrativas, ensaios clínicos, estudos de caso e estudos experimentais.

1.1.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta do organismo a uma agressão de natureza estéril ou infecciosa que tem o objetivo de restaurar a homeostasia perdida¹⁵ (Figura 1A). Caracteriza-se pela presença dos sinais e sintomas clínicos cardinais da inflamação – rubor, tumor, calor e dor, podendo levar à perda ou redução da função motora e/ou órgãos envolvidos¹⁶.

Apresenta-se de forma aguda ou crônica. Aguda é de duração relativamente curta, pode permanecer por minutos, horas ou poucos dias, e suas principais características são exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas – ocasionando o edema – e migração de leucócitos, com predominância de neutrófilos. Crônica é de longa duração e está, intimamente, associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual¹⁵.

Ambas alterações ocorrem principalmente na microcirculação e são decorrentes da ação de moléculas biologicamente ativas liberadas no local da lesão, denominados mediadores inflamatórios^{15,17,18}. Os mediadores inflamatórios podem

ser de origem celular, por células residentes (macrófagos, células dendríticas e células epiteliais) como a histamina, os eicosanoides, as citocinas, o óxido nítrico (NO), o fator ativador de plaquetas e outras proteínas leucocitárias ou de origem plasmática, como as cininas e os componentes do sistema complemento^{19,20}. As concentrações desses mediadores são rapidamente elevadas durante o processo inflamatório^{15,16} (Figura 1B). Os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do processo inflamatório mediante a liberação de citocinas, destacando-se, inicialmente, a liberação de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) IL-1 e IL-6^{21,22}.

À medida que o processo inflamatório evolui, são liberados mediadores antiinflamatórios que favorecem os fenômenos de resolução da inflamação. Esses mediadores de reparo são representados por fatores de crescimento, na sua maioria produzidos por leucócitos, entre outros. A remodelação tecidual acontece também através da atividade de enzimas como a elastase e fatores de crescimento, como fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento de vasos endoteliais, moléculas de adesão (integrinas), antígeno leucocitário cutâneo e células reguladoras CD4+Foxp3+. Neutrófilos e macrófagos interagem com plaquetas e células endoteliais ou epiteliais para produzir lipoxinas e resolvinas, potentes mediadores anti-inflamatórios e próresolutivos²³ (Figura 1C).

Especialmente os macrófagos residentes desempenham um importante papel durante a resposta imune inata (Figura 1B) e vem sendo cada vez mais estudados devido sua plasticidade funcional em resposta ao microambiente e aos estímulos antigênicos. Dependendo do estímulo recebido podem ser polarizados em M1 e M2, os quais apresentam propriedades distintas na liberação de citocinas, sendo que os primeiros possuem atividades pró-inflamatórias e o segundo²⁴ anti-inflamatória.



Figura 1 – Resposta natural da inflamação.

Legenda: Processo inflamatório, ativação e infiltrado de células. Após uma lesão, na fase inicial da inflamação, neutrófilos são as primeiras células ativadas migrando para o local da lesão. Com o objetivo de reparar o dano, essas células começam a produzir citocinas e outras substâncias pró-inflamatórios. Essas citocinas ativam outras células como os monócitos do sangue que migram para dentro do tecido e se diferenciam em macrófagos. Esses macrófagos vão participar tanto da fase pró-inflamatória quanto anti-inflamatória produzindo citocinas, na tentativa de manter a homeostasia. Nesse momento o processo vai evoluir para resolução ou cronificação. A cronificação ocorre se essa ativação pró-inflamatória é sustentada. TNF: Fator de necrose tumoral; IL-1: interleucina-1, IL-6: interleucina 6. Fonte: Adaptado de Freire e Dyke, 2013²⁵.

A dor nociceptiva de origem inflamatória tem função adaptativa e induz comportamentos de esquiva que favorecem a reparação²⁶. É resultado de mecanismos complexos que incluem compressão das fibras nervosas locais devido ao edema e à ação de mediadores inflamatórios sobre as terminações nervosas que podem sensibilizar ou estimular nociceptores gerando hiperalgesia²⁷.

Diversos mediadores podem levar ao surgimento da dor nociceptiva, tais como o TNF, a IL-1β, as prostaglandinas (PGs), o fator de crescimento do nervo (NGF) e a bradicinina^{15,28}. O NGF participa do processamento da resposta nociceptiva por diversos mecanismos, tais como: interação com receptores trkA de nociceptores, o que leva à sua ativação; regulação da expressão gênica em nociceptores, induzindo a liberação de neuropeptídios como substância P e CGRP, que estão envolvidos na transmissão central e na modulação da resposta nociceptiva e regulação da

expressão de receptores do tipo TRPV1 e de canais para sódio. O TNF e a IL-1β são citocinas que induzem facilitação da resposta nociceptiva por meio do NGF²⁷. As PGs e a bradicinina interagem com receptores acoplados à proteína G, ativando proteínas cinases que fosforilam receptores e canais iônicos, o que resulta na redução do limiar nociceptivo²⁸ (Figura 2).





Legenda: A lesão tecidual causada pela inflamação via o extravasamento do plasma e infiltrados de células imunológicas como os macrófagos, células T e neutrófilos no tecido danificado. O infiltrado de células imunológicas e células residentes, incluindo mastócitos, macrófagos e queratinócitos, liberam mediadores inflamatórios como a bradicinina, prostaglandina, ions hidrogênio (H+), adenosina trifosfato (ATP), fatores de crescimento neural, citocinas pro-inflamatórias (TNF, IL-1β e IL- 6) e quimiocinas pro-inflamatórias (CCL2, CXCL1 e CXCL5). Neurônios nociceptivos expressam os receptores para todos os mediadores inflamatórios, os quais agem em seus respectivos receptores nas fibras nervosas nociceptivas periféricas. Esses receptores incluem receptores acoplados à proteína G, receptores inotrópicos, receptores de tirosina quinase, e suas ativações resultam na ativação de um segundo mensageiro como o Ca²⁺ e o AMP cíclico, os quais ativam várias quinases, como a PKA, PKC, CaMK, PI3K e as MAPKs, ERK, p38 MAPK e JNK. A ativação dessas quinases causa a hipersensibilidade e hiperexcitabilidade dos neurônios nociceptivos (conhecida como sensibilização periférica) através da modulação de moléculas transdutoras chaves, como o TRPA1, TRPV1, Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9 e Piezo. Os Neurônios nociceptivos ainda expressam TLR3, TLR4 e TRL7, os quais podem ser ativados

por ligantes exógenos e endógenos. TNF: Fator de necrose tumoral; IL: Interleucina; CCL2: Ligante 2 da quimiocina; CXCL1: Quimiocina 1; CXCL5: Quimiocina 5. Fonte: Adaptado de Ji, Xu e Gao, 2014²⁹.

1.1.2 Modelos animais de dor inflamatória

Uma grande variedade de técnicas tem sido amplamente desenvolvida por extrapolação de experiências clínicas em seres humanos e baseadas em aspectos comparativos da fisiopatologia da dor em seres humanos e animais³⁰. Fármacos, técnicas ou métodos usados para prevenir ou controlar a dor devem, ainda, ser adaptados individualmente para cada paciente, uma vez que a dor é uma experiência particular e individual, baseando-se no grau do trauma tecidual, características comportamentais do indivíduo, grau de dor avaliado e estado de saúde do indivíduo³¹.

Estudos experimentais envolvendo dor inflamatória geralmente utilizam compostos com potencial antigênico, tais como o CFA³² ou a carragenina³³. O CFA, elegido por esse estudo, é composto por óleo de parafina com mono-oleato de manitol agindo como um surfactante em suspensão, acomodando uma microbactéria (*Mycobacterium tuberculosis ou Mycobacterium butyricum*) morta. Por sua vez, a carragenina é composta por polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas³⁴.

O modelo de CFA, quando administrado de forma subcutânea, induz aumento nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1β (Interleucina-1 beta), resultando nos sinais cardinais da dor, como edema, aumento de temperatura e hiperalgesia, característicos do processo inflamatório^{35,36}. Os critérios para elegibilidade de um modelo não-clínico incluem a fisiopatogênese similar à humana, facilidade de uso e reprodutibilidade de dados. O modelo com CFA está bem estabelecido na literatura^{32,36–38} e permite a quantificação dos mediadores envolvidos nas alterações celulares durante o processo inflamatório.

Neste modelo, já foram observados diferentes perfis de células imunológicas ao longo do tempo (6h e 96h) a partir da administração do CFA. Foi demonstrado que, seis horas após a indução da inflamação, inicia-se um aumento significativo do número de neutrófilos, com pico em 24h, e que após 96 h, as células mais encontradas no tecido epitelial da pata de ratos foram monócitos e macrófagos. Ambos os grupos celulares liberam mediadores endógenos, como β -endorfinas, no local da inflamação que medeia a analgesia no processo fisiopatológico^{36,39}.

Em síntese, a inflamação caracteriza-se por ser um processo fisiopatológico amplo, incluindo alterações celulares, vasculares e estímulo de mediadores pró e antiinflamatórios, almejando a homeostase do organismo frente a um agente agressor. Assim, entende-se que o modelo de CFA é capaz de reproduzir essa condição em camundongos, sendo útil em estudos de dor crônica e inflamação^{32,36–38}.

1.1.3 Dor

A International Association for the Study of Pain (IASP) conceitua a dor como sendo "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial⁴⁰. Essa condição pode ainda ser classificada de acordo com o mecanismo fisiopatológico que ela contempla: de origem nociceptiva, quando ocorre ativação de nociceptores; de origem nociplástica, quando causa alteração no processamento central da dor; ou de origem neuropática, quando há lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial⁴¹.

A dor representa um fator clínico, social e problema econômico importante em todas as idades. A dor musculoesquelética é a dor percebida como proveniente de estruturas como ossos, articulações e músculos e que persiste por mais de três meses^{42,43}. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 20 a 33% da população mundial apresenta algum tipo de dor musculoesquelética crônica, com sofrimento nas atividades diárias e aumento no consumo de fármacos⁴³. Desta forma, é possível observar que condições dolorosas tem grande impacto negativo na qualidade de vida quando comparadas com outros problemas de saúde e são os que mais contribuem à deficiência em todo o mundo. Economicamente, a despesa total estimada da dor é em até 3% do produto interno bruto, esse custo maior é maior do que doenças cardíacas ou câncer⁴⁴. Já os custos diretos envolvem a prestação de serviços de saúde e pagamentos por incapacidade. Essas despesas combinadas resultam em uma carga significativa nos sistemas de saúde e na sociedade como um todo⁴⁵.

Além dos fatores sócio econômicos, a escolha da terapia manual mais adequada pelo fisioterapeuta para o tratamento da dor também não está muito clara. A literatura já apresenta dados consistentes sobre a eficácia da terapia manual na dor musculoesquelética, porém os mecanismos endógenos envolvidos, a melhor dose, tempo, tipos de cargas mecânicas e suas respostas ainda são incipientes. Desse modo, estudos não clínicos de ciência básica, em que a avaliação se limita a transmissão sensorial dolorosa, denominada de nocicepção, tornam-se relevantes para os futuros estudos e tratamentos de quadros dolorosos⁴⁶. Naturalmente, as diferenças anatômicas e funcionais entre ratos, camundongos e seres humanos devem ser levadas em consideração; no entanto, enfatizando o sistema fascial abordado neste estudo, investigações em diferentes tipos de mamíferos revelaram respostas fisiológicas adaptativas comuns em resposta à estimulação mecânica^{47–49}.

Para melhor investigar o processamento da dor, as etapas da nocicepção a partir desse estímulo doloroso (mecânico por exemplo) devem ser entendidas, pois referem-se a um processo complexo de interpretação e percepção que ocorre em etapas distintas, descritas como: transdução, condução, transmissão, modulação e percepção⁵⁰.

A primeira etapa denominada transdução, refere-se à conversão da energia gerada por um estímulo nocivo de origem térmica, mecânica ou química em um potencial de ação pelos receptores sensoriais, sendo estes denominados nociceptores⁵⁰. Nociceptores são neurônios especializados que detectam e respondem a formas potencialmente prejudiciais de energia, como o calor / frio nocivo, mecânico e químico no ambiente⁵¹, ilustrados pelas fibras mielínicas do tipo A delta (A δ) e não-mielínicas do tipo C, que terminam com seus prolongamentos no corno posterior da medula espinal (CPME)⁵². Ademais, estão distribuídas por todo o corpo, incluindo superfícies articulares, derme, periósteo, pleura parietal, pericárdio e sistema fascial⁵³. Anátomo-funcionalmente, o nociceptor apresenta corpo celular, axônio e terminal pré-sináptico; responde a estímulos mecânicos (tátil e pressão), térmico e químico, que, por sua vez, eliciam modificações neuroquímicas e funcionais, da periferia para a medula espinal e, por último, para o cérebro⁵⁴.

A partir da estimulação dos nociceptores, cuja informação desencadeia o processo de transdução e, por consequência, um potencial de ação de membrana da fibra nervosa, ocorre uma sequência iniciada nos neurônios de primeira ordem⁵⁵, situados no gânglio sensorial do nervo espinal (GSNE), neurônios de segunda ordem, localizados no CPME, neurônios de terceira ordem, presentes no tálamo, e de quarta ordem, no córtex⁵⁶.

A condução, segunda etapa, consiste na propagação do impulso elétrico do sistema nervoso periférico (SNP) até o sistema nervoso central (SNC). Ela inicia nas

fibras de neurônios nociceptivos primários, denominadas de fibras do tipo C, e nas fibras do tipo $A\delta^{50}$. As fibras $A\delta$ geram a primeira dor, caracterizada por ser rápida e pontual, cuja sensação é de uma picada; as fibras C estão relacionadas à segunda dor, caracterizada como uma sensação de queimação, além de ser menos precisa, mais lenta e mais desagradável⁵². As informações sensoriais recebidas pelos neurônios do CPME aferentes primários, que inervam a pele e tecidos mais profundos do corpo, são processadas por uma rede de circuitos que envolvem interneurônios inibitórios (relacionados à analgesia) e excitatórios (referentes à facilitação e à ativação neuronal)⁵⁷.

A transmissão ocorre no CPME, o qual é constituído por seis lâminas; os neurônios nociceptivos periféricos transmitem a informação nociceptiva do SNP para o SNC por meio da liberação de neurotransmissores, que agem em seus receptores pós-sinápticos, nos neurônios do CPME, que por sua vez se projetam para centros encefálicos superiores, especificamente para o tálamo, liberando neurotransmissores⁵⁰.

A modulação ocorre em nível espinal, bem como em locais mais superiores, é feita por vias descendentes inibitórias ou facilitatórias, que modulam a transmissão nociceptiva na medula espinal⁵⁰. Toda a atividade neuronal aferente atinge as lâminas, que são constituídas por substância cinzenta da medula espinal e são o principal local de modulação da dor. A 1ª lâmina é responsiva principalmente a estímulos nocivos do tecido cutâneo e profundo, e a 2ª lâmina parece desempenhar um papel importante no processamento e modulação dos estímulos nocivos⁵⁸. Por fim, a percepção (processo de identificar se é ou não ameaçador) é caracterizada pela chegada desse estímulo ao córtex cerebral, que compreende a assimilação desses sinais que chegam e transmitem essa atividade sensorial para áreas específicas do córtex cerebral e são interpretados como dor⁵⁰.

No encéfalo, diferentes áreas são responsáveis pelas diversas respostas à dor⁵⁹. O córtex pré-frontal define o que a pessoa vai fazer para conter o estímulo: se vai administrar medicamentos, procurar ajuda médica, entre outros (aspecto cognitivo da dor). Já o córtex sensorial identifica local e intensidade da dor (aspecto sensorial da dor); a amígdala ativa a memória da dor⁵⁹, e o córtex insular fornece uma arquitetura sensório-motora, que se manifesta em aspectos emocionais contínuos, orientando nossos comportamentos e fornecendo base estrutural para interações sob

motivações e sentimentos (aspecto emocional da dor)⁶⁰, funcionando, assim, como um sistema neural para perceber e responder às demandas homeostáticas⁶¹.

A dor pode ser temporalmente dividida em aguda e crônica. Quando ocasionada por processos inflamatórios, essa divisão está intimamente vinculada à fase do processo inflamatório em que se encontra. Todavia, a diferenciação entre esses conceitos pode apresentar grande subjetividade^{62–64}. A dor aguda, com duração de até três meses, é definida como dor de início recente e de duração provavelmente limitada. Usualmente, tem um ponto de identificação temporal e correlação causal com uma determinada lesão ou doença⁶⁴, contemplando a agudização do processo inflamatório⁹.

Em contraste, há a dor crônica com duração de mais de três meses ou que persiste após a cura da lesão inicial. Ela pode se manifestar espontaneamente ou ser provocada por vários estímulos endógenos e exógenos, com resposta tipicamente exagerada em duração, amplitude ou ambas⁹. Geralmente, está associada a afecções inflamatórias crônicas e/ou a doenças degenerativas, com alterações das células residentes, e pode entrar em um processo inflamatório retroalimentado, caso sua resolução não seja atingida⁶⁵.

1.1.4 Mecanismos endógenos de controle da dor

A modulação endógena da dor pode ser definida como as adaptações do corpo a informações nociceptivas vindas da periferia, de maneira aguda bem como a longo prazo, podendo ocorrer em todos os níveis do sistema nervoso, tais como periférico (tecidos), espinal (medular) ou supra espinal. Todos esses sítios geram diferentes mecanismos de modulação da dor, dependendo da natureza da lesão, bem como de fatores endógenos⁶⁶. A dor nociceptiva (dor potencial) começa a ser modulada no SNP pela ação de neuromediadores (por ex.: bradicinina, prostaglandinas e serotonina) e, no SNC, pela liberação de neurotransmissores (por ex.: noradrenalina, serotonina, encefalinas e dopamina). O corpo humano possui sistemas endógenos descendentes de controle da dor. Sabe-se que esse controle tem início no tronco encefálico e pode diferentes sistemas (opioidérgico, adenosinérgico, canabinoidérgico, ativar noradrenérgico, serotoninérgico, etc.)⁶⁷. Em 1999, Melzack descreveu a teoria da neuromatriz da dor, que envolve uma rede neuronal com componentes somatossensoriais, límbicos e tálamocorticiais, sendo que essas regiões cerebrais estavam relacionadas a outros sistemas, como o imune e o opioide⁶⁸. Esses sistemas atuam de diferentes formas no controle da dor, pois são dependentes por sua vez, do tipo de receptor envolvido, do sítio de ação no CPME e das sinalizações neuroquímicas que regulam o balanço entre facilitação e inibição⁶⁷. No presente estudo, analisou-se o papel dos sistemas opioide e canabinóide.

1.1.4.1 Sistema opioide

Opioides são todas as substâncias, endógenas ou sintéticas, que geram efeitos similares aos da morfina^{55,69,70}. Produzem analgesia em seres humanos e outros animais e são capazes de modificar resposta neuronal a estímulos nociceptivos por meio da atuação em receptores específicos (μ , κ e δ os principais)⁷¹.

Na esfera molecular, os receptores opioides (RO) estão acoplados à proteína G e assim influenciam os canais iônicos, modulam as concentrações intracelulares de cálcio e modificam a fosforilação de proteínas. Essa atuação ocorre por duas vias: uma pré-sináptica, onde inibem a abertura dos canais de cálcio, impedindo a liberação do transmissor; e outra pós-sináptica, por meio da abertura dos canais de potássio, provocando hiperpolarização e, consequentemente, inibindo os neurônios pós-sinápticos^{69,72}.

Os opioides endógenos que se conectam a esses receptores foram identificadas como encefalinas, dinorfinas e endorfinas^{55,73}. As encefalinas derivam da proteína precursora proencefalina e possuem afinidade pelos receptores opioides μ e δ . As dinorfinas derivam da clivagem da prodinorfina e exibem afinidade para os receptores opioides κ . As endorfinas derivam da clivagem da proteína precursora proencefala procursora de proteína e possuem afinidade pelos receptores opioides κ . As endorfinas derivam da clivagem da proteína precursora proopiomelanocortina e possuem afinidade para receptores $\mu^{74,75}$.

Os RO podem ser encontrados em diversas partes do corpo⁷⁶, como nos terminais dos neurônios aferentes periféricos, CPME, substância cinzenta periaquedutal e hipotálamo, sendo responsáveis pela ligação a opioides exógenos e endógenos⁷³. No final da década de 1980, estudos começaram a mostrar que os opioides ativam não apenas os RO no cérebro e na medula Espinal, mas também nos neurônios sensoriais periféricos. Desde então, um modelo detalhado das vias opioides fora do SNC foi desenvolvido e aplicações como a injeção intra-articular de morfina foram introduzidas na prática clínica de rotina⁷⁷ (Figura 3). Esses receptores no SNC estão presentes no tálamo, córtex cerebral, amígdala, núcleo accumbens, tronco

encefálico, substância negra, formação reticular, substância cinzenta periaquedutal e medula espinal⁷¹. No SNP, estão presentes em neurônios aferentes primários, gânglios e nervos entéricos^{78,79}. Além do sistema nervoso, os receptores opioides também têm sido descritos em órgãos como rins, pulmões, baço, testículos, ovários, útero, estômago, fígado, glândulas adrenais coração⁸⁰ e tecidos conjuntivos^{81,82}.



Figura 3 – Expressão de receptores opioides no neurônio sensorial periférico.

Legendas: Leucócitos circulantes contendo peptídeo opioide extravasam após ativação de moléculas de adesão (por exemplo, ICAM-1; integrina beta₂). O fator liberador de corticotropina (CRF), quimiocinas ou noradrenalina (NA, liberado pelos neurônios simpáticos) pode induzir a liberação de opioides pela ativação de seus respectivos receptores (receptores para CRF, CRFR; receptores adrenérgicos, AR) nos leucócitos. Opioides exógenos (OE) ou peptídeos opioides endógenos (OP, triângulos verdes) ligam-se a receptores opioides (RO), que são sintetizados no gânglio sensorial do nervo espinal e transportados ao longo dos microtúbulos intraaxonais para os terminais periféricos (e centrais) dos neurônios sensoriais. A subsequente inibição dos canais de íons excitatórios (por exemplo, TRPV1, Ca²⁺) e da liberação da substância P (sP) resulta em efeitos antinociceptivos. Fonte: Adaptada Stein, 2009⁷⁷.

Esta vasta disposição em diversos tecidos confere ao sistema opioide a influência em funções imunológicas, emocionais, neuroendócrinas e autonômicas⁸³, mas sua principal atuação está no controle da nocicepção⁷⁹, visto que a maior parte dos receptores está presente no sistema nervoso, e que o principal efeito dos opioides é a analgesia⁸⁴.

O estímulo doloroso inflamatório nos tecidos periféricos é um ativador da regulação opioide em neurônios sensoriais, assim como para a expressão desses receptores na periferia. Perifericamente, a regulação analgésica depende da modulação da excitabilidade neuronal, sendo um fenômeno observado quando o tecido se encontra em condições inflamatórias⁷⁹. Nessa condição, as células imunológicas como linfócitos (neutrófilo) e macrófagos, quando estimuladas por citocinas, rapidamente migram para o tecido inflamado, liberando peptídeos opioides endógenos⁷⁹.

Todo esse processo resulta em uma alta densidade de receptores nos terminais nervosos periféricos, que contribuem para o efeito analgésico dos opioides nos tecidos inflamados. A partir da lesão tecidual, inicia-se uma cascata inflamatória, consistindo em ativação de células residentes e subsequente liberação de mediadores inflamatórios, que permitem a infiltração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos). Em fase inicial, há envolvimento dos opioides centrais e periféricos, que surgem de granulócitos, principalmente neutrófilos, após as seis primeiras horas, com pico em 24h; em fase mais tardia da inflamação, quando a analgesia endógena é mediada predominantemente por receptores periféricos, aproximadamente 96h após o início do processo inflamatório, há um predomínio de monócitos (macrófagos e linfócitos)^{36,39}; por outro lado, influenciam a transmissão da informação nociceptiva, tornando mais prevalente a duração e intensidade do quadro doloroso^{77,79,85}.

Além dos leucócitos infiltrados, os queratinócitos, que são células residentes, também são capazes de liberar β-endorfinas por meio da ativação dos receptores: receptor para endotelina-B e receptor canabinoide 2 (R-CB₂)^{77,85}. Em seguida, ocorre um aumento da quantidade do RO no gânglio sensorial do nervo espinal, e o transporte axonal desses receptores para a terminação central é aumentado³⁹, levando a uma elevação da eficácia do agonista nas terminações periféricas (Figura 3)⁸⁶. Estudos sugerem que ocorre um aumento do grau de acoplamento entre os receptores opioides e a proteína G e uma elevação dos níveis de adenosina

27

monofosfato cíclico^{87–89}, influenciando a resposta analgésica modulada perifericamente⁷⁷.

A morfina é conhecida por ser um opioide exógeno, amplamente utilizada para fins analgésicos tanto central quanto perifericamente. Ela possui afinidade para os três receptores opioides. Sua ação analgésica pode ser antagonizada pela naloxona, um derivado sintético da oximorfona que antagoniza RO, considerada o agente que mais se aproxima de um antagonista competitivo relativamente puro⁹⁰. Foi postulado que antagoniza os três RO no cérebro (μ , δ e k), com maior afinidade para receptor μ^{50} .

Investigações destinadas ao sistema fascial e sua relação com o sistema opioide ainda são escassas. Sabe-se da presença do seu receptor no tecido conjuntivo frouxo⁸¹, além de que no fibroblasto (principal célula da fáscia) a liberação de fatores inflamatórios, principalmente interleucina-1β (IL-1β), induz a expressão e liberação de opioides endógenos, que, uma vez ligados aos receptores⁹¹ das fibras nervosas periféricas, desencadeiam o aumento das correntes de potássio e a diminuição das correntes de cálcio nos corpos dos neurônios sensoriais, inibindo o disparo neuronal e a liberação do transmissor.

Além disso, a ativação de neurônios em áreas do sistema supressor descendente, tais como no tálamo, substância periaquedutal cinzenta e núcleo magno da rafe provocam a liberação de substâncias opioides e não opioides. Pacientes com dor crônica apresentam dificuldade em ativar o sistema supressor devido a mudanças estruturais e anatômicas no sistema nervoso. Portanto, as técnicas de fisioterapia podem estimular as vias descendentes pelo sistema lateral (opioide) e ventrolateral (não opioide) liberando neurotransmissores inibitórios. Na utilização de estratégias de reabilitação como a neuroestimulação eléctrica transcutânea (TENS), manipulação articular, pelo exercício físico regular, exercício aeróbico e acupuntura, os estudos mostram preferência pela ativação opioide, com a liberação de peptídeos do tipo endorfinas que atuam via receptor μ^{92} .

Dessa forma, nota-se a importância do papel do sistema opioide no processo de analgesia. No entanto, tornam-se necessárias investigações de outros possíveis alvos terapêuticos, neste caso, intervenções direcionadas ao sistema fascial, pois estas não causam efeitos adversos indesejáveis, visto que o uso isolado de morfina e outros opioides apresenta tolerância e efeitos colaterais indesejáveis^{77,93}.

1.1.4.2 Sistema canabinoide

O sistema canabinoide (SC) é outro importante fenômeno relacionado ao mecanismo endógeno de controle da dor. Constitui-se principalmente de enzimas de degradação e dos receptores canabinoides (R-CB₁ e R-CB₂), seus ligantes exógenos: como tetrahidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD), e endógenos: N-araquidonoil etanolamina (anandamida – AEA) e 2-araquidonoil-glicerol (2-AG), sendo os mais estudados.

A ativação desses receptores inibe a adenilato ciclase, com consequente fechamento dos canais de cálcio, abertura dos canais de potássio e estimulação de proteínas cinases. O R-CB₁ é o mais abundante receptor GPCR no cérebro, expresso predominantemente nos neurônios pré-sinápticos, conferindo efeitos psicoativos e emocionais, mas também é encontrado no SNP⁹⁴. De fundamental importância para o conhecimento da área médica é entender que os agonistas endógenos e os R-CB₁ estão presentes em vários outros órgãos da periferia. Atenção especial deve ser dada à sua presença no tecido adiposo; já os receptores R-CB₂ estão presentes nas células do sistema imunológico, sistema hematopoiético, terminal periférico do nociceptor, sistema fascial¹² e são ativados na redução da inflamação^{94,95}. Há evidências fisiológicas e farmacológicas demonstrando a existência de outros subtipos de receptores, ainda não clonados⁹⁵.

Os principais agonistas endógenos para receptores canabinoides, como AEA e 2-AG, são derivados de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, principalmente do ácido araquidônico. Agem como mediadores locais em muitos tecidos, sendo produzidos após alterações agudas ou crônicas da homeostase celular⁹⁶. São sintetizados sob demanda (não são pré-formados e armazenados em vesículas) a partir de precursores de ácidos graxos poli-insaturados por enzimas hidrolisantes em resposta ao influxo de Ca²⁺ ou por mobilização de estoques intracelulares desse íon. A AEA é inativada, principalmente, pela ação da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês, *fatty acid amide hydrolase*) em ácido araquidônico e etanolamina.

Ambos os receptores e ligantes estão distribuídos pelas vias de controle da dor no encéfalo, na medula espinal e em neurônios sensoriais periféricos (além de outros tecidos não neuronais)⁹⁷. Do mesmo modo que os RO, os R-CB₁ e R-CB₂ se acoplam às proteínas G inibitórias (GPCR, do inglês, *G-Protein-Coupled-Receptor*)^{95,98} e assim impedem a guanilato ciclase e a produção de adenosina monofosfato cíclico, com consequente fechamento dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem, diminuindo assim a liberação do transmissor⁹⁹. Existe evidência de que os RO e R-CB funcionam sinergicamente na inibição da dor nociceptiva e inflamatória⁹⁹. Os agonistas R-CB₂ produzem efeitos antinociceptivos em modelos de dor inflamatória e nociceptiva e, em alguns casos, esses efeitos envolvem a ativação do sistema opioide. Além disso, os agonistas para os R-CB aumentam o efeito dos agonistas do receptor opioide μ em uma variedade de modelos de analgesia, e combinações de canabinoides e opioides podem produzir efeitos sinérgicos. Alguns dos efeitos antinociceptivos dos canabinoides envolvem a ativação do sistema opioide vice-versa¹⁰⁰.

Diante disso, mecanismos endógenos que contrabalanceiam as alterações de origem inflamatória desencadeadas pela lesão inicial são ativados visando sua regulação. Um exemplo característico é a liberação de opioides endógenos e peptídeos derivados de precursores proteicos sintetizados por células sinoviais, mastócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e células da pele, como queratinócitos e fibroblastos que migraram para os locais de lesão^{101–104}.

1.1.5 Sistema fascial

O Sistema fascial consiste em um contínuo tridimensional de fibras frouxas e densas, integralmente pré tensionadas, permeia todo o corpo se adaptando às forças mecânicas em resposta ao estresse a ele aplicado¹⁰⁵. Incorpora elementos como tecidos adiposos, adventícios, neurovasculares, aponeuroses, fáscia superficial e profunda, epineuro, capsulas articulares, ligamentos, membranas, meninges, expansões miofasciais, periósteo, retináculos, septos, tendões, vísceras e todo o tecido conectivo intra e intermuscular incluindo endo-/peri-/epimisium¹⁰⁶.

A fáscia é o principal tecido conjuntivo desse sistema e anatomicamente é classificada em:

- Superficial: rica em fibras elásticas, encontrada diretamente sob a pele e a camada adiposa superficial, constituída por camadas membranosas com fibras colágenas e elásticas (maior quantidade)^{106–109}.
- (ii) Profunda/muscular: rica em fibras de colágeno, são em maior composição, dividida em aponeurótica e epimisial^{106–109}. A primeira refere-se a todas as "bainhas fibrosas bem definidas que cobrem e

mantêm no lugar um grupo de músculos ou servem para a inserção de um músculo largo", como é o caso das fáscias profundas dos membros, da fáscia toracolombar e da fáscia bainha do reto do abdome¹¹⁰. Esta última refere-se à bainha de tecido conjuntivo que envolve o músculo esquelético e, em alguns casos, está diretamente ligada ao periósteo, como no caso da camada profunda do tronco e do epimísio dos músculos dos membros¹¹¹.

- (iii) Visceral, intimamente ligadas aos órgãos individuais e dando a forma, sustentando o parênquima, bem como todas as lâminas fibrosas que formam os compartimentos dos órgãos e os conectam ao sistema musculoesquelético¹¹⁰.
- (iv) Neural, que são todas as camadas meníngeas e os tecidos conjuntivos que envolvem os nervos¹¹¹.

Todos os sistemas do corpo operam de maneira integrada e funcional, formando diferentes camadas interdependentes com diversas profundidades, desde o periósteo até a pele, produzindo uma estrutura mecanobiológica única^{106,108,109}.

Histologicamente, a fáscia é composta por diferentes tipos de células. As células do tecido conjuntivo produzem o ambiente extra celular conhecido como MEC¹¹², uma grande variedade de substâncias estruturalmente ativas no espaço intercelular, incluindo fibrilas de colágeno, elastina, fibras reticulares e as proteínas interfibrilares (glicosaminoglicanos ou proteoglicanos). É o microambiente físico no qual as células operam. Sua composição apresenta 20% de células (fibroblastos, adipócitos, macrófagos e mastócitos) e 80% de MEC. Parte de sua composição celular está ilustrada na Figura 4¹¹³.



Figura 4 – Matriz celular e sua população celular.

Legenda: Complexo proteíco de mucopolissacarídeos com substâncias estruturalmente ativas no espaço intercelular, incluindo fibrilas de colágeno, elastina e fibras reticulares e as proteínas interfibrilares, conhecidas como substância fundamental - glicosaminoglicanos ou proteoglicanos. Além de células como eosinófilos, fibroblastos, mastócito e linfócito.

Fonte: Adaptada Willians Peter, 1995¹¹³.

A população de células predominante são fibroblastos, responsáveis pela integridade estrutural do tecido conjuntivo e regulação da transmissão de força intra e intercelular. As fáscias também contêm células de miofibroblastos que são fibroblastos especializados que exibem atividades contráteis que regulam o tônus basal do tecido¹¹⁴. São componentes importantes durante a reparação do tecido lesionado e aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais, expressam α-actina, promovem a contração e sintetizam níveis elevados de proteases degradantes da MEC^{115,116}. Os miofibroblastos estão em maior quantidade na fáscia toracolombar, o que poderia estar associada a uma maior ocorrência de microlesões e processos de reparo celular relacionados a essa estrutura (maior demanda mecânica)¹¹⁴. A atividade contrátil ocorre através das junções aderentes, que abrem canais iônicos mecanossensíveis nas células adjacentes, resultando em influxo de Ca ²⁺¹¹⁷. Este

último induz uma contração que pode retroalimentar o miofibroblasto e/ou estimular miofibroblastos adjacentes, sendo importante durante o remodelamento tecidual, principalmente em reparo a lesão.

Na fáscia normal saudável, cerca de 30% dos fibroblastos são fasciócitos, embora esse percentual possa variar, dependendo dos estímulos aos quais o tecido fascial é submetido. Os fasciócitos¹¹¹ são responsáveis pela produção de ácido hialurônico (AH), um lubrificante endógeno presente principalmente entre a fáscia profunda e a fascia muscular. O AH promove o livre deslizamento do músculo sob a fascia profunda (Figura 5)¹¹⁵.



Figura 5 – Meio celular do sistema fascial.

Legenda: Representação esquemática da anatomia microscópica da fáscia profunda/muscular humana. Fasciocitos, fibroblastos, miofibroblastos, telócitos e terminações nervosas livres, disposto nas camadas fibrosas e unidas por tecido conjuntivo frouxo rico em ácido hialurônico. Fonte: Adaptada Fede et al., 2021¹¹¹.

Estudos também trouxeram à luz estruturas fasciais contendo telócitos (Figura 5)¹¹⁸. Embora seu papel e distribuição específicos ainda estejam sob investigação, acredita-se que essas células estejam envolvidas no reparo celular, regeneração,

remodelação, controle imunológico e comunicação celular por meio de junções celulares ou vesículas extracelulares; como tal, eles provavelmente desempenham um papel importante na regulação da dor miofascial e distúrbios fasciais^{111,119}.

Recentemente, os adipócitos fasciais foram identificados na fáscia superficial como uma população única de células adiposas^{120,121}, que possuem diferentes origens de desenvolvimento, localizações anatômicas, características citológicas e funcionais em comparação com adipócitos subcutâneos ou viscerais. Foi observado também que mastócitos (originários da medula óssea), células progenitoras adiposas e adipócitos maduros distribuídos em certas áreas da fáscia, estavam intimamente associados uns aos outros (em agrupamento), e numerosos grânulos carregados de heparina liberados dos mastócitos estavam distribuídos em torno dos pré-adipócitos fasciais. Esses achados, demonstram o papel da fáscia superficial nas respostas alérgicas e imunológicas. O sistema fascial apresenta também receptores hormonais¹²² denotando seu possível papel nas oscilações hormonais.

O complexo sistêmico fascial pode sofrer uma gama de alterações metabólicas e estruturais geradas por: 1) estresse crônico de uma área resultando em aumento da deposição de fibras de colágeno, desorganização da MEC, diminuição da hidratação, do fluxo livre dos metabólitos, ocasionando diminuição da nutrição célular¹²³; 2) alteração da vascularização tecidual, que poderia limitar ou impedir o deslizamento dos tecidos miofasciais durante a imposição de forças, na realização das atividades da vida diária, podendo ocasionar aderências, fibroses, contraturas e dor¹²⁴; e 3) menor deslizamento entre as estruturas, que ocorre quando o ácido hialurônico se torna mais viscoso e menos lubrificante; assim, o tecido fica mais denso, as linhas de força entre as camadas se modificam e os receptores presentes na fáscia passam a ter um limiar nociceptivo alterado¹²⁵. Intervenções direcionadas a esse sistema já mostraram sua eficácia, agindo na resolução da inflamação e melhorando a viscosidade tecidual^{33,126,127}.

1.1.6 Tratamento à distância: Tensegridade e mecanotransdução

O termo tensegridade *(Tensile-integrity structures)* foi cunhado por um consagrado engenheiro Fuller, R. (1962)¹²⁸. Esse modelo matemático utilizado para a construção civil combina a integração entre forças mecânicas (tração e compressão) geradas por elementos rígidos e elásticos, gerando estabilidade. A tensegridade vem

ganhando espaço na área das ciências da saúde. Diversos autores acreditam que o corpo humano sustentado pelo sistema fascial se comporta como um modelo de tensegridade, apresentando em sua macro e micro estrutura elementos rígidos e elásticos que estabilizam o meio interno, gerenciando a compressão ao redor dos órgãos, articulações e músculos, coordenando a transmissão de forças e mecanotransdução ^{123,129–131}. Ingber¹³² propôs que o citoesqueleto é uma estrutura de tensegridade com um arcabouço estrutural mecânico para suportar a integridade celular e ele modela essas tensegridades como icosaedros. Seguindo a lei de Wolff, o citoesqueleto se alinhará de forma a resistir à carga compressiva esmagadora, e a tubulina rígida do citoesqueleto se tornará seus "ossos^{133–135}".

Central a este conceito é o entendimento de que a fáscia confere uma tensão contínua ao sistema. A fáscia apresenta a característica de não linearidade de todos os tecidos biológicos. Em tecidos não lineares, a relação tensão/deformação nunca chega a zero (característica dos materiais lineares), e sempre há tensão inerente ao sistema. O músculo também tem 'tônus' intrínseco e nunca está completamente relaxado, e toda a rede fascial é continuamente tensa, tanto pela tensão intrínseca quanto pelas contrações ativas que podem ser 'ajustadas'. Ao contrário da mecânica das alavancas, as estruturas hierárquicas de tensegridade têm apenas membros de tensão e compressão. As forças são distribuídas por todo o sistema, em vez de concentradas localmente, como nos sistemas de alavancas. O sistema funciona como uma unidade única. Movimento não é flexão de dobradiças, mas expansão, reposicionamento, distribuição e ajustes tensionais¹³⁶. Isso é possível pela propagação das forças mecânicas em receptores de adesão de superfície, como integrinas e caderinas, observa-se também que são canalizadas ao longo dos filamentos do citoesqueleto e concentradas no citoplasma e no núcleo¹³⁰.

A resposta celular a essa ação, pode alterar simultaneamente as atividades de múltiplas moléculas em vários locais no citoplasma e no núcleo, uma resposta que é crucial para o controle da fisiologia celular e do desenvolvimento tecidual¹³⁰, incluindo o desenvolvimento de células neuronais, processamento da dor e regulação da quantidade de glóbulos vermelhos⁴⁰. Além disso, poderia vir a esclarecer como as aplicações locais e sistêmicas de forças tensionais utilizadas na fisioterapia, por exemplo, podem influenciar a distância todos os tipos de tecidos fisiologicamente ativos¹³⁷ (Figura 5). Essas tensões podem ser concentradas em locais distantes na célula devido a restrições geométricas (por exemplo, muitos elementos convergindo
em um local comum), e a eficiência da transferência de força é totalmente dependente do nível de pré-tensão no citoesqueleto, como previsto pelo paradigma da tensegridade (Hu et al., 2003, 2005; Hu e Wang, 2006). Ele também fornece uma base estrutural para o motivo pelo qual a distorção direta dos cílios primários apicais ativa a sinalização mecânica (influxo de cálcio através de canais de policistina sensíveis ao estresse) em condições normais, mas não quando a ligação da integrina basal ou o citoesqueleto interno da actina é interrompido (Nauli et al., 2003; Alenghat et al., 2004).

Assim, esse esquema integrado das células transmitindo forças e deformando várias estruturas em diferentes locais simultaneamente pode explicar por que tantas moléculas e componentes diferentes contribuem para a mecanotransdução celular, incluindo integrinas, canais iônicos sensíveis ao estresse, caderinas, cavéolas, adesões focais, cílios primários, filamentos do citoesqueleto, estruturas nucleares e proteínas da MEC, entre outros (Ingber, 2006). A mecanotransdução já descrita, é o mecanismo molecular pelo qual a célula detecta e responde a sinais mecânicos convertendo-o numa resposta química ou biológica¹³⁸.

conectividade (interligação) Essa resulta funcionamento em um mecanodependente e neurobiológicamente ativo que nos permite concluir dois pontos cruciais para o entendimento e tratamento de disfunções apresentadas por nosso pacientes: (1) o mau funcionamento de um único elemento pode causar perturbações em outros elementos caso seu reequilibrio não tenha sido restaurado, gerando uma cadeia lesional; (2) terapias manuais podem ter um impacto significativo sobre como os sinais mecânicos são transferidos e convertidos em informações biológicas (mecanotrandução), isto é, forças aplicadas em macro escalas produzem trocas bioquímicas celulares, pois as células são capazes de converter estímulos mecânicos em bioquímicos e/ou em mudanças conformacionais^{136,137,139} (Figura 6).



Figura 6 - Alteração conformacional no meio celular a partir de um estímulo mecânico. Legenda: Uma força local aplicada a integrinas através da matriz extracelular é concentrada em adesões focais e canalizada para filamentos (F)-actina, que é empacotada pela α-actinina e tornada tensa pela miosina ii, que gera pré-estresse. As F-actinas são conectadas aos microtúbulos (Mts) através do fator de reticulação de actina 7 (AcF7), e ao intermediário filamentos (iFs) através da plectina 1. Plectina 1 também conecta iFs com Mts e iFs com nesprina 3 na membrana nuclear externa. Nesprina 1 e nesprina 2 conectam F-actina à membrana nuclear interna proteína sUN1; nesprina 3 conecta a plectina 1 a sUN1 e sUN2. Devido à viscoelasticidade citoplasmática, a propagação de força do ecM para o núcleo pode levar até ~1 ms. as proteínas do sol conectam-se às lâminas que formam a lâmina e o arcabouço nuclear, que se liga à cromatina e ao DNA (por exemplo, através de regiões de fixação de matriz (MARs). Actina nuclear e miosina102 (e titina) pode ajudar a formar o andaime nuclear, controlar o posicionamento do gene e regular o pré-esforco nuclear. a forca canalizada para o andaime nuclear pode afetar diretamente a ativação do gene em milissegundos de deformação da superfície. Por outro lado, leva segundos para que os fatores de crescimento alterem as funções nucleares por desencadeando cascatas químicas de sinalização, que são mediadas por translocação baseada em motor ou difusão. LiNc, ligante de nucleoesqueleto e citoesqueleto; rRNA, RNA ribossômico.

Fonte: Adaptada de Wang et al., 2009¹³⁰.

Em terapia manual na fisioterapia, a pressão manual representa uma carga mecânica direcionada ao sistema fascial e ao contrário do que se pratica há muitos anos, a força aplicada pelas mãos não pode ser escolhida aleatoriamente. No caso

da fáscia, sabemos que diferentes pressões, movimentos e a estimulação adequada da rede neural e do meio celular, principalmente dos fibroblastos por meio do movimento podem promover diversos efeitos¹⁴⁰, pois cada fibroblasto responde prontamente a várias entradas, vários estímulos mecânicos (por exemplo, forças compressivas e tensionais ou estresse de cisalhamento devido ao fluxo de fluido) e/ou químicos (por exemplo, citocinas, hormônios ou hipóxia), influenciando inclusive o comportamento das células adjacentes^{14,130}.

Entender o ambiente mecânico e a resposta celular à carga é essencial para maximizar a função das células musculoesqueléticas e dos tecidos. Estamos expostos diariamente a cargas intrínsecas e extrínsecas. O movimento das articulações, as cargas compressivas na cartilagem durante o caminhar, a gravidade, força reação solo, pressão sanguínea e tensões de cisalhamento nos vasos devido ao fluxo sanguíneo são exemplos⁵⁶.

Definir os mecanismos específicos pelos quais as forças externas e internas são detectadas pelas células e como esse estímulo leva a respostas específicas é fundamental e provavelmente ajudará a explicar como a terapia manual pode ativar os mecanismos neurobiológicos de controle da dor. Porém, um longo caminho de entendimento ainda precisa ser traçado.

Segundo Steffen e Baar (2020)¹³, cargas diferentes resultam em respostas celulares diferentes (Figura 7). As três principais cargas no sistema musculoesquelético são tensão, quando um tecido é puxado em uma direção; compressão, quando um tecido é empurrado sobre si mesmo; e cisalhamento, quando dois tecidos deslizam um sobre o outro^{13,130}.

Em resposta a essas cargas, já sabemos que a carga compressiva aumenta a expressão de proteoglicanos enriquecidos com cartilagem (PGs), como o agrecano. Já proteínas lubrificantes como Prg4/lubricina são reguladas por tensão de cisalhamento¹⁴¹. A simples aplicação de uma tensão de cisalhamento nas células por 24 h resulta em um aumento de três vezes na secreção de lubricina. Porque nocautear a lubricina faz com que os tendões fiquem mais unidos¹⁴², isso sugere que as forças de cisalhamento são necessárias para manter a lubrificação entre os tendões/camadas fasciais, induzindo a produção de proteoglicanos e lubricina na borda do tecido, resultando em uma matriz de colágeno que contém grandes quantidades de fluido na borda do tecido que lubrificam o movimento¹³.

Já as forças tensionais são necessárias para a produção de uma matriz de colágeno alinhada, sem carga tensional¹⁴³, os tecidos conjuntivos saudáveis assumem um fenótipo cicatrizado. Além disso, a tração promove secretamento do colágeno tipo I, resultando em uma matriz de colágeno alinhada e rígida¹³.



Figura 7 – Comportamento do fibroblasto durante as cargas. Legenda: (A) carga em tração; (B) carga em compressão; (C) carga em cisalhamento. Fonte: Adaptada Steffen & Baar, 2020¹³

Esses esclarecimentos nos permitem compreender que cargas aplicadas ao sistema fascial podem ser realizadas de forma local ou a distância. A reação do meio celular em resposta as intervenções, a continuidade fascial e a biotensegridade fundamentam essa hipótese. Alguns autores descrevem fascintegridade, trilhos miofasciais e cadeias miofasciais para conceituar esse princípio, enfatizando inclusive lesões primárias que podem gerar disfunções secundárias em lugares afastados do inicial¹⁴. O tratamento à distância, é muito comum e utilizado na prática clínica do profissional fisioterapeuta, terapeuta manual, osteopata, quiropata entre outros. Nesta premissa, tratar o local exato da lesão nem sempre se faz necessário. A resposta para essas condições que são tão usados na prática clínica, podem estar dentro da própria celuraridade desse tecido como descrito anteriormente.

Com isso, surge a necessidade de enquadrar o sistema fascial em um modelo que possa representar e compreender, prevenir e, possivelmente, restabelecer a função dessa estrutura. Ademais, essas são representações teóricas que precisam de mais avanços para melhor compreensão da fáscia e do comportamento fascial na presença de anomalias anatômicas subjetivas e na presença de disfunções locais e sistêmicas¹⁴.

Desta forma, averiguar a real possibilidade de as intervenções manuais serem realizadas a distância se faz necessário mediante a ausência de evidências disponíveis acerca desses mecanismos de ação.

1.1.7 Inervação sensorial da fáscia na região toracolombar

Ao relacionar dor e sistema fascial (tema principal da presente pesquisa) algumas informações precisam ser elucidadas. Por muitos anos, acreditou-se que a fonte nociceptiva da dor (musculoesquelética) era apenas os músculos, mas o papel da fáscia (como potencial geradora e por retroalimentar) quadros dolorosos, vem sendo reconsiderado¹⁴⁴. Averiguou-se que além disso, todo esse processo pode gerar cronicidade, como descrito anteriormente, e originar um ciclo disfuncional entre dor, restrições neuromusculoesqueléticas e disfunções teciduais¹⁴⁵.

Assim, foi produzida uma revisão de escopo intitulada: *Potential Nociceptive Role of the Thoracolumbar Fascia: A Scope Review Involving In Vivo and Ex Vivo Studies*. Publicada no *Journal of Clinical Medicine* (fator de impacto 4.242) em 2021 -DOI: 10.3390/jcm10194342, que faz parte dessa tese.

Em suma, a verificação de uma inervação segmentar clara pode ter implicações para o papel potencial do sistema fascial na dor. Os estudos publicados até o momento apontam a presença de uma inervação sensorial no sistema fascial e fornecem substrato neurofisiológico para se afirmar que a fáscia também é uma fonte nociceptiva, porém o funcionamento desse circuito está sendo ainda investigado.

1.1.7.1 Receptores opioide e canabinoide na fáscia

Devido relatos da presença do receptor canabinoide (R-CB₁ e R-CB₂) na fáscia humana¹² e receptor opioide no tecido conjuntivo frouxo (μ , $\delta \in \kappa$)⁸¹, associado ao fato do uso desmedido de fármacos (podendo gerar inúmeros efeitos colaterais) na tentativa de alívio da dor¹⁴⁶, foi eleito para este estudo a investigação dos principais mecanismos endógenos no controle da dor, os sistemas opioide (SO) e canabinoide (SC).

Não há evidência até o momento da presença de receptores opioides especificamente nas camadas fasciais, porém combinando abordagens morfológicas e quantitativas incluindo imuno-histoquímica, microscopia eletrônica ou radioimunoensaio, a expressão de encefalinas, dinorfina, β -endorfina e endomorfinas, foi demostrado em tecidos musculoesqueléticos, fornecendo evidências importantes de que esse sistema pode estar equipado com um SO periférico⁸¹.

Em animais e humanos a localização dos peptídeos opioides já foi descrita na articulação⁸², tendão de Aquiles¹⁴⁷, membrana sinovial, periósteo, osso e medula óssea, tecido conjuntivo frouxo, paratendão e junção musculotendínea do tendão de Aquiles. Estudos também demonstraram a expressão de proteínas receptoras opioides μ , δ e κ . A demonstração desse sistema na periferia é um passo essencial para definir novas estratégias para alcançar o controle periférico em condições associadas à dor e inflamação em distúrbios musculoesqueléticos^{81,82}.

Fine e colaboradores (1988)¹⁴⁸, investigaram os efeitos de injeções com bupivacaína a 0,25% e placebo em ponto gatilho miofascial e ainda reverteu esse efeito com naloxona. A injeção com o princípio ativo diminuiu a dor e aumentou a amplitude de movimento em todos os indivíduos, e todas as melhorias foram significativamente revertidas com naloxona intravenosa (10 mg) em comparação com a salina (placebo intravenoso), sugerindo envolvimento do sistema opioide¹⁴⁸.

Em 1991, Stein e colaboradores relataram administração de morfina e naloxona em conjunto com artroscopia do joelho. Seu estudo revelou que a morfina atenuou, enquanto naloxona aumentou a dor pós-operatória, presumivelmente através de um mecanismo periférico⁸².

Além disso, estudos demonstram sua produção também em queratinócitos e fibroblastos^{149,150}. Fibroblastos e queratinócitos expressam RNA mensageiro funcional de proencefalina (PENK - Do Inglês Proenkephalin), estando aptas a sintetizar e secretar peptídeos derivados de PENK, como as encefalinas¹⁵¹. A liberação de fatores inflamatórios, principalmente interleucina-1 β (IL-1 β), induz a expressão e liberação de opioides endógenos, que, uma vez ligados aos receptores das fibras nervosas periféricas, desencadeiam o aumento das correntes de potássio e a diminuição das correntes de cálcio nos corpos dos neurônios sensoriais, inibindo o disparo neuronal e a liberação do transmissor^{152,153}.

A partir dessas informações e da descrição da presença de receptores opioides no tecido conjuntivo¹⁴⁷ e em tecidos articulares⁸², observa-se um efeito mecânico e também neural (SNP ao SNC) dessas células. Além do mais, pode ser otimizado terapeuticamente para obter o controle periférico dos sintomas como no caso de utilização de técnicas de terapia manual.

No sistema fascial, a expressão do sistema canabinoides no fibroblasto (principal célula do sistema fascial) foi demonstrada. Fibroblastos, miofibroblastos, condrócitos e sinoviócitos expressam R-CB₁ e R-CB₂ e enzimas de degradação de ligantes SC. O sistema SC afeta a remodelação de fibroblastos, associada a aderências. Além disso, atenua a nocicepção e a dor, diminui a inflamação nos tecidos miofasciais e desempenha um papel na reorganização dessa estrutura. A compreensão da modulação do SC representa novas abordagens para os profissionais no tratamento de uma variedade de distúrbios estruturais e funcionais¹⁵⁴.

Para a averiguação de expressão de receptores canabinoides na fáscia humana foram realizados isolamento celular e investigação imuno-histoquímica e RT-PCR em tempo real para detectar a expressão de R-CB₁ e R-CB₂. Ambos os receptores são expressos na fáscia humana e nas células de cultura de fibroblastos fasciais humanos, demonstrando que os receptores canabinoides dos fibroblastos fasciais podem contribuir para modular a fibrose fascial e a inflamação¹².

Essa expressão demonstrada de receptores canabinoides no sistema fascial sugeriu o papel da fáscia como fonte e moduladora da dor. Os fibroblastos podem modular a produção dos diversos componentes da MEC, de acordo com o tipo de estímulo: físico, mecânico, hormonal e farmacológico. O agonista do R-CB₂, HU-308 pode levar à produção *in vitro* de vesículas ricas em hialuronano apenas 3 – 4 horas após o tratamento, sendo rapidamente liberado no ambiente extracelular. Demonstramos que essas vesículas são ricas em hialuronano.

Além disso, a incubação com o antagonista AM630 bloqueou a produção de vesículas pelas células, confirmando que a liberação de hialuronano é um efeito mediado por canabinoides. Esses resultados podem mostrar como as células fasciais respondem ao SC, regulando e remodelando a formação da MEC. Além disso, auxiliam nosso entendimento de como as aplicações terapêuticas dos canabinoides no tratamento da dor também podem ter um efeito periférico, alterando a biossíntese da MEC no sistema fascial e, consequentemente, remodelando o tecido e suas propriedades¹². Assim os profissionais de saúde podem utilizar várias ferramentas que regulam

positivamente a atividade do SC¹⁵⁴, incluindo intervenções direcionadas ao sistema fascial.

A produção de hialuronano induzida por canabinoides pode aumentar a capacidade dos feixes de colágeno dentro das fáscias de deslizar em relação aos outros e, consequentemente, melhorar a adaptabilidade do tecido. É confirmado, de fato, que mudanças no conteúdo de fluido, ligações cruzadas e organização molecular e o conteúdo de moléculas específicas de MEC podem modificar as propriedades mecânicas e rigidez ou elasticidade dos tecidos fasciais¹⁵⁵. Ao aumentarem a adaptabilidade e hidratação do tecido, as fibras nervosas espalhadas na fáscia podem ser menos estimuladas¹⁵⁶.

Ainda, o ácido hialurônico está presente em abundância nos tecidos conjuntivos do corpo e apresenta funções de lubrificante e reservatório de eletrólitos e nutrientes. No entanto, alterações na conformação do ácido hialurônico podem resultar em adesão, em vez de lubrificação e hiperestimulação dos receptores, podendo levar a fibrose e dor^{144,157,158}.

Desta forma, é possível que o SC dentro da fáscia profunda e do SO (presente no tecido conjuntivo frouxo) sejam estimulados durante intervenções manuais e exercícios voltados para essa estrutura. McPartland e colaboradores¹⁵⁹ demonstraram que, após o tratamento de manipulação osteopática, o nível sérico de AEA aumentou 168% em relação aos níveis pré-tratamento; e Gamelin e colaboradores¹⁵⁵ demonstraram que o exercício intenso é capaz de modificar os níveis teciduais de eCB e a expressão de genes que codificam para R-CB₁ e R-CB₂.

Ademais, sabe-se que o tecido conjuntivo é um dos principais alvos das terapias manuais e do alongamento, causando a remodelação do citoesqueleto dos fibroblastos¹⁵⁶ e uma modulação dos mecanismos de regulação da inflamação no tecido conjuntivo¹⁶⁰. Consequentemente, podemos supor que intervenções no sistema fascial poderiam ser capazes de estimular os fibroblastos fasciais e, por conseguinte, modular o SC, SO e a liberação de citocinas.

1.1.8 Manipulação do sistema fascial

Intervenções de terapia manual voltadas para o sistema fascial vêm crescendo de forma exponencial dentro dos consultórios voltados para a reabilitação física e dos centros de pesquisas. Embora os termos "fáscia e miofascial" tenham conquistado nas últimas décadas cada vez mais espaço, substituindo o "músculo" em alguns textos, eles ainda são muito mal compreendidos^{123,161,162}. Em muitas aplicações das terapias "miofasciais", as técnicas ensinadas são direcionadas aos músculos individuais (ou unidades miofasciais, mais precisamente) deixando de abordar a fáscia como um sistema e podendo gerar falta de entendimento sobre a aplicabilidade da técnica manual e seus efeitos mecanobiológicos. A mecanotransdução já descrita, que pode ocasionar esses efeitos, é o mecanismo molecular pelo qual a célula detecta e responde a sinais mecânicos convertendo-o numa resposta química ou biológica¹³⁸.

Dentre as intervenções voltadas para o sistema fascial mais conhecidas no Brasil, destaca-se: a (i) Liberação Miofascial¹⁰⁹, terminologia que conceitualmente denota, como sendo: "*aplicação de um alongamento de baixa carga e longa duração no complexo miofascial, destina-se a restaurar o comprimento ideal, diminuir a dor e melhorar a função*", como revisado em 2015¹⁶³; porém essa terminologia muitas vezes é abrangente, incluindo uma gama inespecífica de técnicas manuais como massagem clássica, mobilização articular, ventosaterapia e alongamento clássico. Tornando-se confundidoras quanto sua metodologia de utilização e seus reais efeitos oriundos do sistema fascial e não apenas efeitos associativos por respostas oriundas das outras estruturas trabalhadas. (ii) Método Rolfing^{®164} criado por Ida Rolfing, (iii) Manipulação fascial^{®127} criado por Luigi Stecco, (iii) Trilhos Anatômicos^{®123}, criado por Thomas Myer e (iiiii) Indução Miofascial^{®165} criado por Andrzej Pilat.

Como enfatizado no decorrer deste texto, dose (tempo e intensidade) e direção são desfechos fundamentais para o resultado das técnicas e precisam ser melhor compreendidos. A resposta de uma estrutura, é dependente do tipo de estímulo manual dado pelo profissional. Ter cuidado e entendimento, enaltece a segurança e responsabilidade perante o trabalho desenvolvido¹⁴.

Com base na mecanobiologia da fascia, quatro propriedades que dão base a mecanotransdução, auxiliam em como intervir, otimizando o efeito dose resposta: tensegridade, piezoeletricidade, resposta celular e tixotropismo: (i) Tensegridade: proporciona estabilidade e resistência, assegurando sua integridade global; (ii) Piezoeletricidade: a aplicação de pressões que causam variações nas dimensões de materiais piezoelétricos provocam o aparecimento de campos elétricos nesses materiais; (iii) Resposta celular: devido à grande variedade celular, uma série de efeitos a partir de um estimulo é esperado; (iv)Tixotropismo: liquefação tecidual à

medida que é aplicado uma determinada quantidade de calor ou força mecânica, como pressão, vibração ou cisalhamento^{4,13,14,33,130,166,167}.

Na presente pesquisa foi utilizado a Reorganização Miofascial (RMF)^{4,166}. A RMF foi avaliada por sete especialistas internacionais em terapia miofascial manual, intervenções direcionadas ao sistema fascial e ensino de terapia manual com base na documentação em vídeo do trabalho prático: Andreas Haas, Christopher Veeck, Gil Hedley, Peter Schwind, Thomas Findley, Til Luchau e Thomas Myers. Com base em sua avaliação escrita, o tratamento manual específico usado neste estudo pode ser descrito como uma manipulação manual do tecido fascial³³, considerado em alguns pontos, similar ao método Rolfing de terapia manual¹⁶⁴.

Na RMF o terapeuta é guiado pela resposta do corpo do indivíduo para determinar a direção da carga, sua intensidade e duração¹⁶⁶. É uma técnica manual que visa contribuir para a homeostase do sistema fascial, mudanças na dinâmica dos fluidos locais, constrição capilar e aumento do fluxo sanguíneo local, restaurando a integridade normal do tecido tratado¹⁶⁷. Não invasiva, almejando a reorganização das estruturas miofasciais. Focada no sistema fascial e aplicando três momentos de cargas mecânicas: (1) pressão tangencial; (2) tração; (3) cisalhamento - Passivo, ativo assistido e ativo. Detalhadamente, a técnica aplica cargas mecânicas combinadas de pressão tangencial sustentada, tração no sentido da restrição tecidual (densificação) e cisalhamento em meia lua sem perder a tensão. Mudanças dinâmicas no tecido conjuntivo denominado fáscia, induzidas pela deformação mecânica manual, podem justificar os resultados observados na aplicação da técnica. Além disso, a fáscia apresenta propriedades viscoelásticas e piezoelétricas que respondem às cargas mecânicas impostas, com uma cascata de eventos eletroquímicos^{4,13,14,33,130,166,167}.

De uma forma geral, podemos aceitar que todas as técnicas tem algum efeito sobre a estrutura trabalhada. É fato que a aplicação de qualquer intervenção sobre uma estrutura biologicamente viva é capaz de gerar respostas. Bialoski¹⁶⁸ descreve (Figura 8) que a força mecânica aplicada por intervenções manuais inicia uma cascata de respostas neurofisiológicas no SNP e SNC, que podem ser responsáveis pelos resultados clínicos observados nos pacientes.



Figura 8 – Modelo abrangente dos mecanismos da terapia manual.

Legenda: O modelo sugere que um estímulo mecânico transitório para o tecido produz uma cadeia de efeitos neurofisiológicos. Setas sólidas denotam um efeito de mediação direto. Setas quebradas denotam uma relação associativa que pode incluir ¼ de uma associação entre um construto e sua medida. As caixas em negrito indicam a medição de uma construção.

Fonte: Adaptado Bialosky et al., 2009¹⁶⁸.

Nesse contexto, dos efeitos e resultados das terapias manuais direcionadas ao sistema fascial, e para melhor elucidar os achados literários das intervenções direcionadas ao sistema fascial, uma tabela foi desenvoldida (Tabela 1).

Tipo do estudo	Amostra	Intervenção	Principais descobertas
Estudo experimental.	Ratos com inflamação	Animais suspensos e tracionados	Diminuição da distância da passada
	do tecido subcutâneo	pela cauda (5 e 10 min manhã e	e do comprimento do passo
	da lombar com	tarde) por 12 dias.	(p=0,001) durante a análise de
	carragenina.		marcha por impressão de pegadas.
Estudo experimental.	Camundongos com	Três momentos aplicados na FTL:	Aumento de TGF-β1 (p=0,04) e IL-4
	inflamação na FTL com	1) Pressão contínua e carga de	(p=0,02), sem alterar as
	carragenina.	cisalhamento a 45°, por 3 min); 2)	concentrações de MCP-1, TNF e IL-
		Carga de tração por 10 min; e 3)	6 (p>0,05).
		Carga de pressão diagonal, com	
		compressão por 7 min.	
Ensaio clínico.	59 participantes com	Intervenção fascial: 1) liberação da	Intervenção fascial parece ser mais
	dor no pescoço	base do crânio, ajustando a relação	eficaz do que a terapia manual para
	alocados em 2 grupos.	do reto posterior da cabeça	corrigir a posição avançada da
		músculos à dura-máter; 2) liberação	cabeça (p=0,014), recuperar a ADM
		bruta do músculo	em flexão lateral (p=0.001) e
	Tipo do estudo studo experimental. studo experimental. Ensaio clínico.	Tipo do estudoAmostraistudo experimental.Ratos com inflamação do tecido subcutâneo da lombar com carragenina.istudo experimental.Camundongos com inflamação na FTL com carragenina.istudo experimental.Camundongos com inflamação na FTL com carragenina.Ensaio clínico.59 participantes com dor no pescoço alocados em 2 grupos.	Tipo do estudoAmostraIntervençãoStudo experimental.Ratos com inflamação do tecido subcutâneo da lombar com carragenina.Animais suspensos e tracionados pela cauda (5 e 10 min manhã e tarde) por 12 dias.Studo experimental.Camundongos com inflamação na FTL com carragenina.Três momentos aplicados na FTL: 1) Pressão contínua e carga de cisalhamento a 45°, por 3 min); 2) Carga de tração por 10 min; e 3) Carga de pressão diagonal, com compressão por 7 min.Ensaio clínico.59 participantes com dor no pescoço alocados em 2 grupos.Intervenção fascial; 1) liberação da base do crânio, ajustando a relação do reto posterior da cabeça músculos à dura-máter; 2) liberação bruta do músculo

Tabela 1: Sumarização de estudos (pré-clínico, clínico e revisão sistemática) que utilizaram como tratamento intervenção fascial.

		 3) liberação dos músculos supra- 	rotação (p=0,031) e melhorar a
		hióideos e infra-hióideos; e 4)	qualidade de vida.
		liberação da fáscia retro-hióidea.	
		TM: 1) anteroposterior e lateral da	
		cervical coluna, 2) técnica de	
		energia muscular envolvendo flexão	
		da coluna cervical, 3) técnica	
		neuromuscular para rotação restrita	
		de C1 e C2, 4) inibidor distração	
		occipital e 5) alongamento cervical.	
Ensaio clínico.	41 participantes com	Protocolo cinesioterapeutico pré	Melhora da dor em todos (-0,99,
	dor no pescoço	estabelecido, associado ao grupo 1	intervalo de confiança de 95% [IC] =
	alocados em 2 grupos.	terapia manual e o grupo 2	-1,82 a -0,16), porém a intervenção
		intervenção fascial.	fascial foi 20% mais efetiva.
Ensaio clínico.	36 participantes com	Intervenção fascial: 1) Deslizamento	Diminuição da dor (-0,99, intervalo
	lombalgia inespecífica	longitudinal dos músculos	de confiança de 95% [IC] = -1,82 a -
	alocados em 2 grupos.	paravertebrais lombares (3x/lado);	0,16) no grupo que recebeu a
		2) Liberação miofascial da fáscia	intervenção fascial em comparação
		toroco-lombar (5 min); 3) Liberação	com o grupo placebo.
		miofascial do quadrado lombar (7	
		min); 5) Liberação miofascial do	
		músculo psoas (15x/lado).	
	Ensaio clínico. Ensaio clínico.	Ensaio clínico.41 participantes com dor no pescoço alocados em 2 grupos.Ensaio clínico.36 participantes com lombalgia inespecífica 	3) liberação dos músculos supra- hióideos e infra-hióideos; e 4) liberação da fáscia retro-hióidea. <u>TM:</u> 1) anteroposterior e lateral da cervical coluna, 2) técnica de energia muscular envolvendo flexão da coluna cervical, 3) técnica neuromuscular para rotação restrita de C1 e C2, 4) inibidor distração occipital e 5) alongamento cervical. Ensaio clínico. 41 participantes com dor no pescoço alocados em 2 grupos. Ensaio clínico. 36 participantes com lombalgia inespecífica alocados em 2 grupos. Intervenção fascial: 1) Deslizamento longitudinal dos músculos paravertebrais lombares (3x/lado); 2) Liberação miofascial da fáscia toroco-lombar (5 min); 3) Liberação miofascial do quadrado lombar (7 min); 5) Liberação miofascial do músculo psoas (15x/lado).

<u>Continuação</u> da Tabela 1.

			Placebo: "falsa" intervenção fascial,	
			nas mesmas zonas, mas sem	
			deslizamentos.	
Sinhorim e cols.	Série de casos.	Oito participantes	Intervenção fascial:	Aumento no índice de saturação
(2019) ¹⁶⁶		assintomáticos.	Cargas mecânicas (pressão	tecidual no músculo trapézio
			tangencial, cisalhamento e tração)	(80,7±2,7% vs. 89,4±4,6%; p=
			direcionadas ao tecido fascial do	0,002) na comparação pré e pós
			músculo trapézio (Duração 10 min).	intervenção fascial.
Amorim e cols. (2022) ⁴	Ensaio clínico.	50 indivíduos com e	Intervenção fascia:	Aumento do nível de
		sem dor cervicalgia	Cargas mecânicas (pressão	oxihemoglobina do músculo trapézio
		inespecífica alocados	tangencial, cisalhamento e tração)	grupo com cervicalgia em relação
		em 2 grupos.	direcionadas ao tecido fascial do	ao sem cerviclagia (p = 0,01).
			músculo trapézio (Duração 10 min).	
McKenney e cols.	Revisão sistemática. *	Determinar a eficácia	Total 88 estudos.	Resultados positivos com
(2013) ¹⁰⁹		das intervenções	10 incluidos. Bancos de dados:	intervenções fasciais, contudo,
		fasciais como	MEDLINE, CINAHL, Academic	baixa qualidade dos estudos.
		tratamento para	Search Premier, Cochrane Library e	
		condições ortopédicas.	PEDro.	
Ajimsha, Mudahka, Al-	Revisão sistemática. *	Ensaios clínicos para	Total 133 estudos.	Intervenção fascial pode ser usada
Madzhar (2015) ¹⁶³		determinar eficácia das	19 incluídos. Bancos de dados:	como tratamento adjuvante para
		intervenções fasciais.	MEDLINE, CINAHL, Academic	variadas condições
			Search Premier, Cochrane library e	musculoesqueléticas e dolorosas.
			PEDro.	

<u>Continuação</u> da Tabela 1.

Laimi e cols. (2018) ¹⁷³	Revisão sistemática. *	Ensaios clínicos para	Total 513 estudos.	Evidências sobre intervenções
		determinar eficácia da	Oito incluídos. Bancos de dados:	fascial não são suficientes para
		intervenção fascial para	CENTRAL, Medline, Embase,	garantir efetividade dessa
		dor, melhorar ADM,	CINAHL, Scopus e PEDro.	abordagem na dor.
		nível de funcionalidade.		
Fraser JJ e cols.	Revisão sistemática. *	Ensaios clínicos para	Sete incluídos. Bancos de dados:	Melhora na função e algometria (3
(2018) ¹⁷⁴		determinar eficácia da	PubMed, CINAHL, Cochrane e Web	de 3 estudos, IC que não cruzou
		intervenção fascial na	of Science.	zero em 9 de 10 variáveis, ES =
		dor e função na fascite		0,7–3,0) comparado alongamento,
		plantar.		fortalecimento ou modalidades.
López-Torres e cols.	Revisão sistemática. *	Intervenção fascial na	17 incluidos. Bancos de dados:	Intervenção fascial pode ser
(2021) ¹⁷⁵		curva escoliótica e dor	MEDLINE, Google Scholar, Web of	adequada para reduzir escoliose e
		lombar.	Science, BCI, BIOSIS, CCC, DIIDW,	dor lombar. Contudo, pela qualidade
			INSPEC, KJD, RSCI, SCIELO.	dos estudos os achados devem ser
				interpretados com cautela.

Legenda: ADM, amplitude de movimento; EVA, escala visual analógica da dor; PEDro, do inglês, *Physiotherapy Evidence Database*.

*Sem meta-análise.

Algo a salientar é que o não entendimento dos mecanismos que respondem a essas intervenções, à tornam simplista, produzindo apenas efeito em decorrência de um desfecho (antes e depois) e não embasada em uma cascata de eventos neurofisiológicos que culminaram na resolução dos desfechos.

Nesse empasse, com poucos estudos clínicos demonstrando a efetividade das intervenções no sistema fascial, a ideia de estabelecer um protocolo padronizado e ir além, investigando o mecanismo neurobiológico que medeia o efeito analgésico dessas intervenções, utilizando um modelo animal de tratamento e de inflamação, parece ser uma opção coerente para seguir evoluindo no conhecimento acerca dos efeitos da terapia manual sobre o sistema neuromusculoesquelético.

Abordagens eficientes e inovadoras no manejo da dor são necessárias para reduzir a carga e fornecer melhores resultados de saúde para os pacientes¹¹². Nesse sentido, com base no explanado até o momento, intervenções direcionadas ao sistema fascial incluindo a RMF podem ser efetivas no tratamento de disfunções neuromusculoesqueléticas de origem inflamatória. Há necessidade de uma investigação aprofundada sobre a contribuição do sistema fascial e de um melhor entendimento de como as intervenções manuais podem promover um benefício máximo terapêutico¹⁶⁹. Entretanto, apesar da efetividade dentro dos consultórios clínicos, os mecanismos endógenos no controle da dor das intervenções manuais direcionadas a esse sistema ainda não foram estabelecidos.

Com base no exposto até o momento, o presente estudo visa responder três questões principais quando realizado a intervenção manual RMF direcionada para o sistema fascial da região toracolombar de camundongos com inflamação na pata:

1) Há efeito anti-hiperalgésico no tratamento à distância?

2) Há influência do tempo de tratamento no efeito anti-hiperalgésico?

3) Há o envolvimento dos receptores opioide e canabinoide no efeito antihiperalgésico?

Então, para responder os questionamentos e colaborar para o delineamento do estudo, a seguir serão explanados os objetivos, seguido dos métodos necessários para o andamento do estudo.

2. OBJETIVOS

2.10BJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-hiperalgésico da RMF realizada na FTL e o papel dos receptores opioide e canabinoide neste efeito em camundongos com inflamação periférica.

2.20BJETIVOS ESPECÍFICOS

Nesta pesquisa, em camundongos com inflamação na pata induzida pelo CFA e submetidos a única ou a repetidas sessões de RMF na região toracolombar:

- a) Verificar o efeito anti-hiperalgésico da RMF, bem como o melhor tempo de tratamento, sobre hiperalgesia mecânica e edema;
- b) Verificar o envolvimento do sistema nervoso periférico na analgesia causada pela RMF;
- c) Investigar farmacologicamente a participação local (pata e tecido fascial da região toracolombar) e central (medula espinal) de receptores opioide e canabinoide na anti-hiperalgesia produzida pela RMF;
- d) Investigar as alterações do imunoconteúdo dos receptores opioide-μ ou CB₂ na FTL, na pata e na medula espinal;
- e) Investigar o efeito da RMF sobre as concentrações das citocinas: IL-10,
 IL-1β, IL-6 na FTL, na pata e na medula espinal;
- f) Verificar histo-morfologicamente o fibroblasto.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DO ESTUDO

O presente estudo é caracterizado como uma pesquisa experimental não clínica de natureza quantitativa¹⁷⁶.

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Para a realização dos experimentos foram necessários os seguintes fármacos, substâncias, equipamentos e locais:

i) Fármacos:

- CFA (Sigma Chemical Co., St Luis, MO, EUA)
- Salina (LBS Laborasa Indústria Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil)
- Isoflurano (Biochimico, Itatiaia, RJ, Brasil)
- Naloxona (um antagonista para receptores opioides Tocris Cookson Inc., EUA)
- AM630 (AM630, um antagonista seletivo para o receptor canabinoide 2
 Cayman Ann Arbor, Michigan, EUA)
- Lidocaína (Xylestesin[®] Cloridato de Lidocaína Cristália produtos químicos farmacêuticos LTDA, São Paulo SP).

ii) Substâncias:

Tween 80 (Vetec Química Fina, RJ, BR); Actina-HRP (1:35000; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); *Kit* de quimiluminescência (ECL; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA); Tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)]; Deoxicolato de sódio (0,5%, SDS 0,1% e PBS); Ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM; Coquetel de inibidores de proteases 1% (P8340 – Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA); Tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCI 0,2 M e SDS 10%); Gel de poliacrilamida e

SDS (10%); Membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); Anticorpo secundário com peroxidase (1:5000, cabra antirabitt-HRP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH2PO4 1,5 mM, Na2HPO4 20 mM, Tween-20 0,05%); e corante vermelho (Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%); Álcool Santa Cruz; Xilol solven; Parafina solven; Hematoxilina Newprov; Eosina Allkimia; Anticorpos primários, diluídos em TBS-T contendo 1% BSA, contra as proteínas: Receptor CB₂ (1:1000), receptor-μ opioide (1:1000) e beta-actina (1:45000); e Kits ELISA para camundongos: IL-1β (número de catálogo DY401-05, R&D Systems[®], Minneapolis, MN, EUA), IL-6 (número de catálogo DY406-05, R&D Systems[®], Minneapolis, MN, EUA), IL-10 (número de catálogo DY417, R&D Systems[®], Minneapolis, MN, EUA).

iii) Equipamentos:

 Monofilamento de von Frey de 0,6g da VFH (Chicago, EUA); Centrífuga Refrigerada NT 815 (Nova Técnica Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil); Cuba (Bio-Rad mini trans Blot@ Cell, USA); Agitador de tubos vórtex (modelo Q-220B1, Quimis, Diadema, SP, Brasil); Balança digital alta precisão eletrônica (Sf-400 1 g a 10 Kg, Adrialaboratórios, PR, Brasil); Espectrofotômetro (modelo U-2001, Hitachi, Japão); Máquina de Oxigênio (Modelo 2FN, série 0201, Narcosul, Porto Alegre, RS, Brasil), Microcopia trinocular (microscópio Opticam O400s, Opticam Microscopy Technology, Brasil) com o software morfométrico (OPTHD 3.7, Opticam Microscopy Technology, Brasil) e equipamento digital micrômetro.

iv) Local:

- Setores de Comportamento, Bioquímica e Biologia Molecular do Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), localizado no Campus Universitário Grande Florianópolis, unidade Pedra Branca, Bloco I2.
- Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Rua Dr.

Enéas Carvalho Aguiar, 155 - Cerqueira César - 05403-000 - São Paulo - SP

3.3 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes - **3Rs = redução, substituição e refinamento** e guia *Arrive*¹⁷⁷. Foram conduzidos utilizando camundongos *Swiss* machos (25 a 35 gramas de peso corporal / 12 a 14 semanas de idade) obtidos do Biotério da Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), alojados em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16cm) conforme normas do laboratório, e em 22±2°C sob um ciclo luz-escuro de 12 h (luzes acesas às 6 h), com acesso ilimitado a ração *Nuvilab*[®] e água *ad libitum*.

Os animais foram randomizados (manualmente), homogeneamente distribuídos entre os grupos tratamento e controle. Aclimatados no laboratório durante pelo menos 1 hora (h) antes dos testes. Os experimentos foram realizados entre as 7 h e 15 h¹⁷⁸.

3.3.1 Cálculo da amostra

O número de animais utilizados foi o mínimo necessário para demonstrar os efeitos obtidos pelo tratamento. Diante disso, neste estudo foi utilizado n = 8 animais por grupo, baseado no cálculo de Daniel¹⁷⁹, que apresenta as seguintes equações para a obtenção de um coeficiente de confiança de 95:

$n = \{[(z alfa + z beta) * s]/ sigma\}^2$

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

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

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

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

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

Assim, aplicando os valores à fórmula acima, temos:

n= {[(1,96 + 1,28) * 35]/40}² = 8 animais por grupo.

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

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Constituíram 8 etapas para a realização deste estudo (ver tabelas 1-7). Em cada etapa, inicialmente, foram registradas informações basais [peso corporal e resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico do monofilamento de von Frey (vF)]. Após, os animais foram submetidos a injeção intraplantar (i.pl.) de CFA com o intuito de induzir o modelo de inflamação da pata. Avaliações realizadas apartir de 24 h após esse procedimento.

O desfecho primário foi a hiperalgesia mecânica avaliada pelo teste de vF; como desfechos secundários foram analisados: edema, imunoconteúdo de receptores opioide e canabinoide, verificação do envolvimento do sistema nervoso periférico, quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias e análise histológica semiqualitativa.

Após a averiguação do efeito anti-hiperalgésico e a determinação do melhor tempo da técnica para a região toracolombar de camundongos foi verificado a participação dos receptores opioides e canabinoides. A participação desses receptores foi triada inicialmente por meio do pré-tratamento com antagonista não específico naloxona⁷ e AM630¹⁸⁰, respectivamente. Ambos, administrados no primeiro e quarto dia após a injeção de CFA³⁹ em diferentes sítios de modulação da dor:

Intrafascial (i.f.), Intraplantar (i.pl.) e Intratecal (i.t.), com o intuito de confirmar o envolvimento dos receptores testados no efeito anti-hiperalgésico da técnica de RMF.

Posteriormente, grupos de animais foram tratados diariamente por 4 dias para coleta de amostras da pata, fáscia toracolombar (FTL) e medula espinal. Essas amostras foram cuidadosamente retiradas e armazendas para análise do imunoconteúdo dos receptores (opioide e CB₂) por meio da técnica de *Wersten Blot*, citocinas pró- e anti-inflamatórias por meio da técnica Elisa (Ensaio de imunoabsorção enzimática) e análise histológica semiqualitativa. A Figura 9 contempla a linha experimental desta pesquisa.



Figura 9 – Linha do tempo experimental.

Legenda: RMF, Legenda: CFA: Adjuvante Completo de *Freund*; RMF: Reorganização miofascial; D, Dia; CFA, Adjuvante Completo de *Freund*.

Fonte: https://mindthegraph.com

3.4.1 Experimento 1 - Verificação dos diferentes tempos de tratamentos

Após a indução da inflamação, diferentes grupos de animais foram tratados por diferentes tempos [5, 10 e 20 minutos (mim)] com o protocolo de reorganização miofascial (RMF) (item 3.5.2) para determinar o tratamento com melhor efeito antihiperalgésico. Avaliações realizadas em 24 h e 96 h. Nessa etapa, foram utilizados 40 animais. Grupos e respectivos procedimentos estão descritos na Tabela 2.

	•		•
Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	N = 8	CFA	Sem RMF
2	N = 8	CFA	Sham
3	N = 8	CFA	5 min
4	N = 8	CFA	10 min
5	N = 8	CFA	20 min

Tabela 2 – Diferentes tempos de tratamentos para cada grupo.

Legenda: CFA, Adjuvante Completo de *Freund*; RMF, Reorganização miofascial.

Após a determinação do tempo de 10 min, os demais desfechos foram analisados usando somente o esse tempo que promoveu melhor efeito no efeito antihiperalgésico.

3.4.2 Experimento 2 - Avaliação do envolvimento do sistema nervoso periférico

Na segunda etapa foi verificado a participação do sistema nervoso periférico na analgesia causada pela RMF em 24 h e 96 h. Camundongos foram pré-tratados com lidocaína por via intrafascial (fáscia toracolombar) e após 15 min tratados com RMF. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 min após os tratamentos³⁶. Nessa etapa, foram utilizados 32 animais. Os grupos e respectivos procedimentos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação do sistema nervoso periférico no efeito anti-hiperalgésico da RMF via i.f.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	N = 8	CFA	Controle + Salina
2	N = 8	CFA	RMF (10 min) + Salina
3	N = 8	CFA	Lidocaina + Salina
4	N = 8	CFA	Lidocaina + RMF (10 min)

Legenda: i.f., Intrafascial; CFA, Adjuvante Completo de Freund; RMF, Reorganização miofascial.

3.4.3 Experimento 3 – Análise do edema da pata

Na terceira etapa, constituiu verificar o edema da pata (item 3.5.4), como observado na Tabela 4. Nessa etapa, foram utilizados 32 animais.

		•	
Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	N = 8	Salina	Controle
2	N = 8	Salina	RMF (10 min)
3	N = 8	CFA	Controle
4	N = 8	CFA	RMF (10 min)

Tabela 4 – Efeito da RMF sobre o edema da pata.

Legenda: CFA, Adjuvante Completo de Freund; RMF, Manipulação do sistema fascial.

3.4.4 Experimento 4 - Envolvimento do receptor opioide periférico e central

Na quarta etapa, foi verificado o envolvimento do receptor opioide periférico e central em 24 h e 96 h. Camundongos foram pré-tratados com naloxona por via intrafascial (fáscia toracolombar), periférica (I.pl. – Intraplantar) e central (i.t. – central) e, após 15 min, foram tratados com RMF. A hiperalgesia mecânica também foi avaliada 30 min após os tratamentos³⁶. Nessa etapa, foram utilizados 96 animais. Os grupos e respectivos procedimentos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Verificação do envolvimento dos receptores opioides periféricos e centrais no efeito anti-hiperalgésico da RMF na região toracolombar, i.pl. ou i.t.*

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	N = 8	CFA	Controle + Salina
2	N = 8	CFA	RMF (10 min) + Salina
3	N = 8	CFA	Naloxona + Salina
4	N = 8	CFA	Naloxona + RMF (10 min)

Legenda: i.pl., Intraplantar; i.t., Intratecal; CFA, Adjuvante Completo de *Freund*; RMF, Legenda: CFA, Adjuvante Completo de *Freund*; RMF, Reorganização miofascial.

* esses grupos foram utilizados para cada via de administração.

3.4.5 Experimento 5 - Envolvimento do receptores canabinoide periférico e central

Foi verificado o envolvimento do receptor canabinoide periférico no efeito antihiperalgésico da RMF na região toracolombar em 24 h e 96 h. Camundongos com inflamação induzida por CFA na pata foram pré-tratados com AM630 (antagonista seletivo para o R-CB₂) por via intrafascial (fáscia toracolombar), periférica (i.pl. – Intraplantar) e central (i.t. – central) e, após 15 minutos, foram tratados com a RMF na região toracolombar. A hiperalgesia mecânica também foi avaliada 30 minutos após os tratamentos. Nessa etapa, foram utilizados 96 animais. Os grupos e os respectivos procedimentos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Verificação do envolvimento do R-CB₂ no efeito anti-hiperalgésico da RMF na região toracolombar, i.pl. ou i.t.*

Grupos	Ν	Lesão	Tratamentos
1	N = 8	CFA	Sem RMF + Salina
2	N = 8	CFA	RMF (10min) + Salina
3	N = 8	CFA	AM630 + Salina
4	N = 8	CFA	AM630 + RMF (10 min)

Legenda: CFA, Adjuvante Completo de Freund; RMF, Reorganização miofascial.

* esses grupos foram utilizados para cada via de administração.

3.4.6 Experimento 6 - Quantificação do imunoconteúdo do receptores opioide e canabinoide

Na sexta etapa, foram realizadas as coletas de amostras em 96 h após injeção de CFA e tratamento com RMF diário. Para a quantificação do imunoconteúdo dos receptores opioides e canabinoides (item 3.5.6) da FTL, pata e medula. Nessa etapa, foram utilizados 64 animais. Os grupos e respectivos procedimentos estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Quantificação do imunoconteúdo dos receptores opioides e canabinoides.

Grupos	Ν	Lesão	Tratamentos
1	N = 8	Salina	Controle
2	N = 8	Salina	RMF (10 min)
3	N = 8	CFA	Controle
4	N = 8	CFA	RMF (10 min)

Legenda: CFA, Adjuvante Completo de Freund; RMF, Reorganização miofascial.

3.4.7 Experimento 7 e 8 - Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1β, IL-6 e IL-10)

Para a realização da sétima etapa, foram realizados dois experimentos, com o intuito de quantificar citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-10, IL-1β, IL-6) em 96 h após

injeção de CFA e tratamento com RMF diário. Amostras da fáscia da região toracolombar, pata e medula espinal de camundongos com inflamação induzida por CFA na pata e tratados com RMF na região lombar foram coletadas e analisadas por meio do ELISA (item 3.5.7). Nessa etapa, foram utilizados 64 animais. Os grupos e respectivos procedimentos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Determinação da quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Amostras de tecido da região lombar, da pele, da pata e da medula espinal.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	N = 8	Salina	Sem RMF
2	N = 8	Salina	RMF (10 min)
3	N = 8	CFA	Sem RMF
4	N = 8	CFA	RMF (10 min)

Legenda: CFA, Adjuvante Completo de Freund; RMF, Reorganização miofascial.

3.4.8 Analise histológica semiquantitativa

Na etapa 8 foram realizados experimentos para retirada de amostras do região toracolombar e pata (item 3.5.8). Foram utilizados 32 animais. Os grupos e respectivos procedimentos estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Analise histológica semiquantitativa. Amostras da região toracolombar e pata.

Grupos	Ν	Lesão	Tratamentos
1	N = 8	Salina	Sem RMF
2	N = 8	Salina	RMF (10 min)
3	N = 8	CFA	Sem RMF
4	N = 8	CFA	RMF (10 min)

Legenda: CFA, Adjuvante Completo de Freund; RMF, Reorganização miofascial.

Por fim, foram necessários um total de 392 camundongos machos, visto que foram realizadas 8 etapas e cada uma teve uma técnica de tratamento nas análises comportamentais, assim foi possível otimizar um grupo controle para cada experimento.

3.5 ENSAIOS, TESTES E TÉCNICAS

3.5.1 Modelo de inflamação persistente induzido pelo CFA

Modelo animal de inflamação periférica induzida pela administração i.pl. (Figura 10 - B) de CFA de uma solução concentrada a 50%, dissolvida em solução salina 0,9% e Tween[®] 80, foi utilizado. Cada animal recebeu 20µl dessa solução na pata traseira direita. Esse procedimento produz uma robusta hiperalgesia, a qual pode ser identificada pelo aumento da resposta ao estímulo mecânico produzido com o uso dos monofilamentos de vF^{36,181,182} (Figura 10 - C).





Legenda: (A) Pata do camundongo naive; (B) Injeção intraplantar (i.pl.) de 20 µl de CFA 50%; (C) Pata do camundongo 6h após a injeção i.pl. de CFA.

Fonte: https://mindthegraph.com

3.5.2 Tratamento com RMF

A execução da técnica de RMF foi realizada sempre pela mesma fisioterapeuta, com 17 anos de experiência clínica e realização prévia do curso para manejo de animais. O tratamento da fáscia foi realizado utilizando a técnica RMF^{4,33,166,183}.

O protocolo de tratamento da região toracolombar dos camundongos, foi realizado conforme descrito previamente por França e cols.³³ com a modificação de diferentes tempos de tratamento. O protocolo desenvolvido foi baseado em estudos anteriores sobre anatomia e dissecção do complexo fascial em camundongos

realizados em nosso laboratório (dados não publicados), com o objetivo de preservar os princípios da técnica aplicada em humanos, buscando encontrar a correspondência mais adequada entre características do tratamento humano quando aplicado a camundongos. Além disso, a abordagem manual adaptada para o experimento foi baseada em evidências já descritas na literatura^{123,167,184,185}.

Durante o procedimento, os animais foram anestesiados com isoflurano a 2% com 100% de oxigênio. O protocolo de RMF foi aplicado da seguinte forma:

<u>Fase 1</u>: Momento preparatório, carga oblíqua e cisalhamento. Duração de 1 min e 30 s, animal em decúbito ventral. O fisioterapeuta ancorava a inserção inferior do complexo fascial da região lombar (próximo à cauda) com um dedo; com outro dedo, o terapeuta realiza tangencialmente pressão sustentada em 45°, com posterior carga em cisalhamento, na inserção superior, na direção cranial (Fig. 11A).

<u>Fase 2</u>: Técnica direta, carga em tensão e cisalhamento. Duração de 5 min, animal em decúbito ventral, o fisioterapeuta ancorava a área de inserção inferior do tecido fascial toracolombar com dois dedos na altura do ilíaco do animal (lados direito e esquerdo) mantendo esse ponto fixo e sustentado; e com dois outros dedos na inserção superior, o terapeuta aplicou uma carga de tração e posterior cisalhamento contínuo em direção crânio caudal do animal (Fig. 11B).

<u>Fase 3</u>: Técnica diagonal, carga oblíqua e cisalhamento. Duração de um 1min e 45s para cada diagonal. O animal foi cuidadosamente posicionado em decúbito dorsal nas mãos do fisioterapeuta (em berço). Em seguida, os dedos indicadores do terapeuta ficaram de um lado, e os dedos anulares do outro lado da coluna lombar do animal, de forma a contemplar todo o complexo fascial da região toracolombar. A terapeuta realizou um ponto diagonal de pressão, com carga compressiva e posterior cisalhamento, primeiro com um dedo indicador e um anular e, posteriormente, trocando a pressão para os demais dedos (indicador e anelar), formando assim um X na região toracolombar do animal (Fig. 11C). Cada diagonal foi sustentada em momentos separados.



Figura 11 – Aplicação do protocolo de RMF. Legenda: (A) preparatório; (B) técnica direta; e (C) Técnica diagonal. Fonte: Adaptado de França e cols., 2020³³.

O grupo controle da intervenção passou pelos mesmos procedimentos de preparo, sedação e o toque manual na região toracolombar do animal, utilizando as mesmas fases e tempo, contudo sem aplicação das cargas mecânicas enfatizadas na RMF.

3.5.3 Avaliação hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de vF, com carga de 0,6g (Figura 10). No dia anterior ao experimento, todos os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal, com exclusão daqueles com resposta maior a 20%.

No dia do teste, os animais foram colocados em uma plataforma (70 x 40 cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma. Posteriormente, o monofilamento foi aplicado no local designado pelo círculo (Figura 12), utilizando um protocolo adaptado de Martins e colaboradores (2016)³⁶. O filamento foi aplicado na pata posterior direita, por um período de 2 – 3 segundos, com um leve período de descanso entre cada estímulo, atendendo a alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais só foram avaliados quando as quatro patas estiverem acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio¹⁸⁶. Os valores percentuais referentes à frequência de resposta, frente a 10 estimulações, foram considerados como indicativo de hiperalgesia mecânica conforme o escore obtido.

A hiperalgesia mecânica foi avaliada dependente de cada experimento (24 h e 96 h) após a injeção i.pl. de CFA, antes e após os tratamentos (tempo a ser definido)¹⁸². Além disso, todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador treinado em manejo de animais e na realização do teste de vF (Figura 12).



Figura 12 – Avaliação da hiperalgesia mecânica.

Legenda: Representação do teste comportamental de hiperalgesia mecânica denominado teste do filamento de von Frey. O animal fica ambientando individualmente sobre uma plataforma de arame. A frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de *von Frey*, será registrada em porcentagem e utilizada como indicativo de resposta hiperalgésica. cm: centímetros. Fonte: <u>https://mindthegraph.com</u>

3.5.4 Avaliação do edema da pata

A avaliação do edema foi realizada medindo a espessura da pata traseira (porção medial) por meio de um micrômetro digital (Insize[®], SP, Brasil) (Figura 13). Os valores foram expressos conforme o valor bruto obtido com a mensuração na região mencionada da pata traseira direita de cada animal³⁷. As avaliações foram realizadas nos tempos de 0 h, 1 h e 24 h após após o tratamento com RMF.





3.5.5 Avaliação da participação do receptores opioide e R-CB2 no efeito anti-

hiperalgésico induzido pela RMF

A participação dos RO e R-CB₂ periféricos no efeito anti-hiperalgésico induzido pela RMF foi avaliada em 24 h e 96 após a indução da inflamação com CFA i.pl. Para tanto, 15 minutos antes da intervenção com RMF, os animais foram tratados por via i.pl. ou i.t. com veículo AM630 ou Naloxona. Grupos separados de animais foram tratados com veículo AM630 ou Naloxona. Em todos os experimentos, a hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 min após os tratamentos com RMF ou controle.

3.5.6 Avaliação do imunoconteúdo dos receptores opioide e canabinoide periféricos e centrais – Western Blotting

No quarto dia após a RMF diária, os animais foram submetidos a morte indolor assistida (MIA) e as amostras da pata, FTL e medula espinal foram coletadas e armazenadas a -80 °C até o seu processamento. Para preparação das amostras, os tecidos congelados foram pulverizados em nitrogênio líquido e foi adicionado o tampão lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-

sulfonil (PMSF) 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% e, em seguida, incubados em gelo por 30 minutos.

Os homogenatos foram centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos a 4 °C; o sobrenadante (correspondente ao extrato total) foi coletado, e uma alíquota foi separada para a dosagem de proteína em cada amostra, a qual foi determinada através do método de Bradford. Ao restante do sobrenadante, foi adicionado o tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCI 0,2 M e SDS 10%) na proporção de 1:6. As amostras foram fervidas (95 °C; 5 minutos) e permanecerão armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

Para separação de proteínas e imunodetecção, todas as amostras foram mantidas em gelo até o completo descongelamento. Depois, quantidades iguais de proteínas para cada amostra (50 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (10%). A etapa de transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de PVDF foi realizada sob as seguintes condições: 90 V e 30 mA por 1 h e 30 min Em seguida, as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%) para visualização das proteínas. Após lavagens em TBS-T (NaCI 137 mM, KCI 2,7 mM, KH2PO4 1,5 mM, Na2HPO4 20 mM, Tween-20 0,05%), para a retirada do excesso do corante, as membranas foram imersas em solução de TBS-T contendo BSA 5%, por 1 h, a temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas. Na sequência, as membranas serão incubadas durante 14 – 16 h (2 – 8 °C), sob agitação, com os anticorpos primários, diluídos em TBS-T contendo BSA 1%, contra as proteínas de interesse: receptor R-CB₂, receptor opioide-μ e β-actina. Ao término do período de incubação, as membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T, e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:5000, cabra anti-rabitt-HRP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) (exceto para anti-β-actina-HRP) por 1 h em temperatura ambiente.

Após esse período, uma nova lavagem de 30 minutos com TBS-T foi realizada, seguida pela exposição das membranas durante 1 minuto ao *kit* de quimiluminescência e revelação através de um fotodocumentador (*iBright CL1000, Thermo Fischer Scientific*). As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria, com o auxílio do programa *Image Studio Late*. Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a β -actina e expressos graficamente como unidades arbitrárias.

3.5.7 Determinaçã das concentrações das citocinas inflamatórias – ELISA

No quarto dia após a RMF diária, os animais foram submetidos a MIA e as amostras da pata, FTL e medula espinal foram coletadas e armazenadas a -80 °C até o seu processamento. Para determinação dos níveis teciduais de citocinas pró e antiinflamatórias, o material armazenado a -80 °C foi descongelado, e as amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em solução salina tamponada (PBS) contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 0,1 mM, ácido etillenodiaminotetracético (EDTA) 10 mM, Aprotinina 2 ng/ml e cloreto de benzametônio 0,1 mM. Os homogenatos foram transferidos para tubos Eppendorfs de 1,5 ml, centrifugados a 6000 × g por 20 minutos a 4 °C. O conteúdo total de proteínas foi mensurado no sobrenadante, usando-se o método de Bradford. Alíquotas de 100 µl de cada amostra foram usadas para a determinação dos níveis de IL-1β, IL-6 e IL-10, usando-se ELISA Kits comerciais para camundongos da Thermo Fischer Scientific, de acordo com instruções do fabricante. Os níveis de citocinas foram estimados por interpolação a partir de uma curva padrão, por colorimetria (comprimento de onda de correção: 540 nm) em um espectrofotômetro (Berthold Technologies – Apollo 8 – LB 912, Bad Wildbad, KG). Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína.

3.5.8 Análise histológica semiquantitativa

No quarto dia após a RMF diária, os animais foram submetidos a MIA e as amostras da pata e região lombo dorsal foram coletadas e armazenadas em formol tamponado a 10% até o seu processamento. Para a análise morfométrica, as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% e incluídos em parafina. Cortes de 5,0 µm foram usados para lâminas histológicas de hematoxilina e eosina (HE). Os achados histológicos foram avaliados semiquantitativamente por seis parâmetros (Tabela 10): celularidade, proporção de células semelhantes a fibroblastos, proporção de células orientadas paralelamente, proporção de fibras colágenas grandes e bem formadas, proporção de fibras paralelas e espessura da fáscia. Para análise morfométrica, as fotomicrografias foram feitas em um sistema de captura de imagem composto por um microscópio trinocular (microscópio Opticam O400s, Opticam

Microscopy Technology, Brasil) com o software morfométrico (OPTHD 3.7, Opticam Microscopy Technology, Brasil). Para análise, no caso da região lombar, foram analisadas amostras especificamente da FTL. Com relação a pata, as amostras não puderam ser analisadas pois esfarelaram durante o corte para as lâminas.

Item	Descrição:	
Celularidade	 Baixo: células raras são vistas mesmo em campo de alta potência (400x) Moderado: poucas células são vistas em campo de alta potência (400x) Marcado: as células são facilmente vistas no campo de potência média/alta (100x/400x) Intenso: as células são facilmente vistas mesmo em campo de baixa potência (40x) 	
Célula assemelha-se a fibroblastos em HE	Proporção	
Células orientadas paralelamente	1. 0-24% 2. 25-49% 3. 50-74% 4. 75-100%	
Fibras de colágeno grandes e bem formadas		
Fibras orientadas para paralelo		

Tabela 10: Parâmetros de avaliação histológica semiquantitativamente.

Legenda: HE, hematoxilina histológica e eosina.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis deste estudo estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – \	Variáveis do	estudo.
--------------	--------------	---------

Variáveis	Тіро	Natureza	Proposta de utilização
RMF/MFS	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim ou não
Naloxona (Antagonista Opioide)	Independente	Quantitativa nominal dicotômica	Sim ou não
AM630 (Antagonista R-CB ₂)	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim ou não
Edema	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio-padrão
Hiperalgesia mecânica	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Frequência de retirada da pata em (%) Média e desvio-padrão

Citocinas (IL-10, IL-1β, IL-6)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	pg/mg de proteína Média e desvio-padrão
Imunoconteúdo do receptor canabinoide (R-CB ₂)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Intensidade de pixels Média e desvio-padrão Em unidades arbitrárias
Imunoconteúdo de receptor opioide (µ)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Intensidade de pixels Média e desvio-padrão Em unidades arbitrárias
Analise fibroblasto	Independente	Semiqualitativa nominal dicotômica	Sim ou não

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram inicialmente tabulados em uma planilha do programa Microsoft Excel. Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste estatístico Shapiro-Wilk. Os resultados foram ser apresentados como média e desvio-padrão (distribuição paramétrica) ou mediana e intervalo interquartil (distribuição não paramétrica). A análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias foi utilizada caso os dados sejam paramétricos seguida pelos: post hoc testes Student-Newman-Keuls ou o teste de Bonferroni. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o *software* GraphPad Prism 8.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número de registro: 19.049.2.07.IV (ANEXO 1). Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelas exigências estabelecidas em Guia para o cuidado e uso de animais experimentais (*Canadian Council on Animal Care*).

Além disso, foi seguido o princípio dos 3R's: substituição (*replacement*); redução (*reduction*); e refinamento (*refinement*). O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram os mínimos necessários para demonstrar o efeito do tratamento recebido. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e o guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes, assim como o guia *ARRIVE* (ANEXO 2) para estudos não clínicos.

Foi utilizado o mínimo de animais por meio de diferentes estratégias: utilizar um mesmo grupo de animais para realizar outros testes, sem que isso interfira na fidedignidade dos resultados ou provoque distresse e dor em demasia aos animais. Ademais, o modelo de dor da proposta do estudo apresenta outro ponto positivo, que se dá pela condução breve das avaliações e dos tratamentos após a indução do modelo, o que reduz o sofrimento dos animais. Ainda assim, foram garantidos a capacidade técnica e a competência de todos os envolvidos no processo de execução dos experimentos, bem como o cuidado no manejo diário dos animais no biotério, sempre com acesso livre a água e ração.

O uso dos animais foi o mínimo possível, bem como a intensidade dos estímulos expostos durante os tratamentos e avaliações. Todos os animais foram submetidos a MIA por um profissional habilitado (Médico Veterinário responsável pelo Biotério Experimental do LaNEx, Geraldo Jorge Severgnini Bernardes, CRMV/SC 0452) ao final dos experimentos, conforme as disposições da resolução número 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) de 12 de maio de 2012, assim como da Instrução Normativa número 13 – Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) de 20 de setembro de 2013. O método foi por meio de uma overdose anestésica (cloridrato de xilazina 30 mg/kg associada a cloridrato de cetamina 150 mg/kg pela via intraperitoneal) seguida de aplicação de solução eutanásica T61[®], por via intraperitoneal. Após a MIA dos animais e coleta de material biológico, as carcaças foram armazenadas no freezer -20°C do LaNEx até sua coleta pela empresa responsável (Servioeste Soluções Ambientais LTDA).
4. ARTIGOS

Essa tese é composta por dois artigos: 1) uma revisão de escopo e 2) um artigo original de estudo pré-clínico em que os resultados e discussão representam a íntegra desta tese. As referências bibliográficas no final do trabalho contemplam somente as citações apresentadas na estrutura da tese, uma vez que o artigo tem suas referências apresentadas na sua própria composição.





Potential Nociceptive Role of the Thoracolumbar Fascia: A Scope Review Involving In Vivo and Ex Vivo Studies

Larissa Sinhorim ^{1,2}^(D), Mayane dos Santos Amorim ^{1,3}, Maria Eugênia Ortiz ^{1,2}, Edsel Balduino Bittencourt ^{1,4}, Gianluca Bianco ^{1,5,6}^(D), Fabiana Cristina da Silva ⁷^(D), Verônica Vargas Horewicz ^{1,2}^(D), Robert Schleip ^{8,9,*}^(D), William R. Reed ^{10,11}^(D), Leidiane Mazzardo-Martins ¹²^(D) and Daniel F. Martins ^{1,2}^(D)

- ¹ Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina, Palhoça 88137-272, Brazil; larissasinhorim@hotmail.com (L.S.); mayane_amorim@hotmail.com (M.d.S.A.); gegephisio@gmail.com (M.E.O.); edselb64@gmail.com (E.B.B.); gianluca.bianco@posturologiaclinica.eu (G.B.); vhorewicz@hotmail.com (V.V.H.); danielmartinsfisio@hotmail.com (D.F.M.)
- ² Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça 88137-272, Brazil
 ³ Human Movement Sciences Graduate Program, College of Health and Sport Science at Santa Catarina State University, Florianópolis 88080-350, Brazil
- ⁴ Coastal Health Institute, Jacksonville, FL 32224, USA
- ⁵ Research Laboratory of Posturology and Neuromodulation RELPON, Department of Human Neuroscience, Sapienza University, 00147 Rome, Italy
- ⁶ Istituto di Formazione in Agopuntura e Neuromodulazione IFAN, 00147 Roma, Italy ⁷ Cielda Haalth Education Porto Alarra 00150,002 Provide chicis@empil.com
 - Cirklo Health Education, Porto Alegre 90150-003, Brazil; fabisis@gmail.com
- ⁸ Department of Sport and Health Sciences, Technical University of Munich, 80799 Munich, Germany
- ⁹ Department for Medical Professions, DIPLOMA University of Applied Sciences, 37242 Bad Sooden-Allendorf, Germany
- ¹⁰ Department of Physical Therapy, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA; wreed@uab.edu
- ¹¹ Rehabilitation Science Program, Departments of Physical and Occupational Therapy, School of Health Professions, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA
- ¹² Postgraduate Program in Neuroscience, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil; leidiane.mazzardo@ufsc.br
- * Correspondence: robert.schleip@tum.de; Tel.: +49-89-346016

Abstract: Nociceptive innervation of the thoracolumbar fascia (TLF) has been investigated over the past few decades; however, these studies have not been compiled or collectively appraised. The purpose of this scoping review was to assess current knowledge regarding nociceptive innervation of the TLF to better inform future mechanistic and clinical TLF research targeting lower back pain (LBP) treatment. PubMed, ScienceDirect, Cochrane, and Embase databases were searched in January 2021 using relevant descriptors encompassing fascia and pain. Eligible studies satisfied the following: (a) published in English; (b) preclinical and clinical (in vivo and ex vivo) studies; (c) original data; (d) included quantification of at least one TLF nociceptive component. Two-phase screening procedures were conducted by a pair of independent reviewers, after which data were extracted and summarized from eligible studies. The search resulted in 257 articles of which 10 met the inclusion criteria. Studies showed histological evidence of nociceptive nerve fibers terminating in lower back fascia, suggesting a TLF contribution to LBP. Noxious chemical injection or electrical stimulation into fascia resulted in longer pain duration and higher pain intensities than injections into subcutaneous tissue or muscle. Pre-clinical and clinical research provides histological and functional evidence of nociceptive innervation of TLF. Additional knowledge of fascial neurological components could impact LBP treatment.

Keywords: fascia; in vivo; ex vivo; innervation; pain; thoracolumbar fascia; nociceptor; lower back pain; scoping review



Citation: Sinhorim, L.; Amorim, M.d.S.; Ortiz, M.E.; Bittencourt, E.B.; Bianco, G.; da Silva, F.C.; Horewicz, V.V.; Schleip, R.; Reed, W.R.; Mazzardo-Martins, L.; et al. Potential Nociceptive Role of the Thoracolumbar Fascia: A Scope Review Involving In Vivo and Ex Vivo Studies. *J. Clin. Med.* 2021, *10*, 4342. https://doi.org/10.3390/ icm10194342

Academic Editors: Tomasz Halski and Cyrus Motamed

Received: 16 August 2021 Accepted: 20 September 2021 Published: 24 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/).

1. Introduction

The process by which intense thermal, mechanical or chemical stimuli are detected by a subpopulation of nociceptive peripheral nerve endings is called nociception [1–5]. Nociceptors have a peripheral and central axonal branch that innervates their target organ and spinal cord, respectively [1,2,6,7]. Their cell bodies are located in the dorsal root ganglia (DRG) for the trunk and extremities and in the trigeminal ganglion for the face [8–10]. There are two major classes of nociceptors [1–3,6,7]. The first includes medium diameter myelinated (A δ) afferents that mediate acute, well localized nociception [2–4,6,7]. The second class of nociceptor includes small diameter unmyelinated "C" fibers that convey poorly localized nociception. Most C fibers are polymodal (heat and mechanical sensitive) [2–4,6,7]. Often, heat-responsive unmyelinated afferents develop mechanical sensitivity only in the injury setting [11]. These afferents are more responsive to chemical stimuli (capsaicin or histamine) and are likely to come into play when the chemical milieu of inflammation changes their properties [1,2,12–14]. However, not all C fibers are nociceptors. Some respond to innocuous cooling, while others respond to innocuous stroking of the hairy skin and appear to mediate pleasant touch [15].

C nociceptive fibers project to the superficial dorsal horn (laminae I & II) of the spinal cord, which is organized into anatomically and electrophysiological distinct laminae [1,2,6,7]. The heterogeneity of C fibers has been demonstrated by their neuroanatomical and molecular characterization [16]. For example, the so-called peptidergic population of C nociceptors release the neuropeptides, substance P, and calcitonin gene-related peptide (CGRP); the nonpeptidergic population of C nociceptors express the c-Ret neurotrophin receptor that is targeted by glial-derived neurotrophic factor (GDNF) [1,2,17]. It has been demonstrated that CGRP and SP can act synergistically to promote inflammation and nociceptor sensitization, since they are released by the peripheral or central projections of primary afferent neurons [18,19]. In the periphery, CGRP and SP induce the production and release of inflammatory cytokines, thus contributing to the peripheral sensitization of nociceptive neurons [20]. Centrally, when released into the spinal cord, CGRP and SP also induce central sensitization by acting on dorsal horn neurons [21]. Interestingly, it has been shown that CGRP can inhibit the degradation of SP and thus prolong its action [22]. Finally, CGRP may contribute to mechanical hyperalgesia or allodynia by enhancing the response of wide dynamic range neurons to cutaneous stimulation [23,24].

Musculoskeletal (MSK) pain is defined as acute or chronic pain that affects bones, muscles, ligaments, tendons, and even nerves [25-30]. According to the World Health Organization (WHO), 1.75 billion people have some form of chronic MSK pain [31]. Inadequately managed MSK pain can adversely affect quality of life and impose significant socioeconomic problems. For example, lower back pain (LBP) is the main contributor to disability worldwide [25–30]. However, the mechanisms that underlie its development remain poorly understood [26–30]. It has been demonstrated that there is nociceptive innervation in connective tissues associated with nerves [32], tendons [33], and joints [34–38]. Together, these findings strongly suggest a role in the etiology of pain, and additional studies of nociceptive innervation of connective tissue will help to relate connective tissue dysfunction with LBP [39,40]. To date, it has been demonstrated that when healthy subjects underwent an injection of hypertonic saline into the thoracolumbar fascia (TLF), it resulted in pain of greater intensity, more unpleasant quality, and spreading over a greater area of the back and lower limbs, compared to similar injections into muscle or subcutaneous tissue [41–44]. Furthermore, this pain was associated with chemical stimulation rather than mechanical distention [42]. These studies suggest that the TLF makes a distinct contribution to nociception.

The TLF is a major connective tissue structure that can resist high tensile loads due to its fibers being oriented in multiple planes [45–47]. It has been shown that the thoracolumbar fascia shear strain was ~20% lower in human subjects with chronic lower back pain [48]. TLF consists of several layers. The posterior layer covers the deep muscles (deep lamina) of the back and attaches with the spinous processes via the supraspinous ligament. This posterior layer of the TLF consists of two separate laminae. The superficial lamina forms a continuation of the aponeurosis of the latissimus dorsi muscle as well as of the aponeurosis of the gluteus maximus muscle. It usually contains many dense collagen fibers crossing to the contralateral side below L2, which constitutes a very rare feature within mammalian anatomy and is probably associated with a contralateral force transmission between latissimus dorsi on one side and the gluteus maximus of the opposite side during human locomotion. This layer is also continuous with the external oblique musculature [49]. Anterior is the deep lamina, which blends with the supraspinous ligament cranially and with the long head of the biceps femoris muscle via the sacrotuberous ligament caudally [50,51]. The deep lamina is usually much thinner than the superficial lamina. Both laminae contain a multitude of smaller blood vessels, but do not contain any large arteries or veins [52,53]. Although the biomechanical properties of TLF are extensively documented and discussed in the literature, the neural properties have relatively received very little attention to date [39].

Despite nociceptive innervation of the TLF having been investigated over the past few decades in various animal models and humans using neuroanatomical and molecular techniques, these studies have not been compiled and their collective findings appraised. The purpose of this scoping review was to assess current scientific knowledge on the nociceptive innervation of the TLF in animal and human in vivo and ex vivo experiments to act as a resource for future clinical research targeting TLF in clinical treatment.

2. Materials and Methods

A scoping review methodology was selected to compile and evaluate data relating to the current state of scientific knowledge available in the literature related to TLF nociception and to identify the gaps that need to be addressed. The framework chosen was based on the guidelines provided by Arksey e O'Malley (2005) [54], Preferred Reporting Items for Systematic reviews, extensions of Meta-Analyzes, Scoping Reviews (PRISMA-ScR, Data Sheet S1), and randomized clinical trials. Human and preclinical studies were included.

2.1. Step 1: Identifying the Research Question

The aim of this scoping review was to identify the role of nociceptive innervation of the TLF in musculoskeletal pain.

2.2. Step 2: Identifying Relevant Studies

A search strategy was developed using a combination of relevant keywords (Data Sheet S2). The search was conducted in June 2021 in the electronic databases of PubMed, ScienceDirect, Cochrane, and Embase. Based on the scoping review methodology, the search filters used were the following: (a) pre-clinical studies; (b) clinical trials; (c) until the year 2021; (d) full text. Additional filters used were the following: (1) Species: human and animals; (2) Language: English; (3) Sex: female and male.

Both animal models and human studies were included. A combination of DeCs descriptors in English was used: fascia, pain, and lower back pain. After excluding duplicate articles, titles and abstracts were read for later selection to read the full text. Through the search for the DeCs descriptors, we found the following numbers of articles: (a) fascia and pain, 217 articles; (b) fascia and nociceptive pain, 13 articles (all duplicates); (b) fascia and nociceptive pain and innervation (in vivo studies/ex vivo studies), 15 articles (all duplicates); (e) fascia and nociceptive pain and myofascial pain syndrome, 3 articles (a single article duplicated); (f) fascia and nociceptive pain and lower back pain, 9 articles (all duplicates).

2.3. Step 3: Study Selection

Inclusion and Exclusion Criteria

The inclusion criteria consisted of the following: (a) studies published in English; (b) complete studies (c) preclinical and clinical (in vivo and ex vivo) studies; (d) original data studies; (e) studies involving the relationship between fascia and pain; (f) included quantification of at least one analysis of any nociceptive component of thoracolumbar fascia.

Studies were excluded if classified as the following: studies involving the relationship between fascia and proprioception, usage protocols, clinical intervention, fasciotomy, surgical procedures and medicine, practical guidelines, unpublished manuscripts, dissertations, reviews, expert comments, books and/or chapters of books, registered reports, conference proceedings.

Records screened by title and abstracts numbered 214. After reading the abstracts, 154 were excluded due to failure to meet the inclusion criteria. Fully read articles numbered 60, and of these, 48 were excluded because the content did not address the proposed theme, included interventions, or were related to fasciotomy, surgical procedures associated with the usage of medication, crural fascial, or proprioceptive innervation of facial tissue (Figure 1). In the end, two tables containing a total of 12 articles were developed: (a) Table 1—ex vivo studies and (b) Table 2—in vivo studies.



Figure 1. Flowchart diagram (file in attachment).

Studies (Authors, Years)	Specie, Condition, n	Method	Main Findings
Corey et al., 2011 [55]	Rats, Naïve, n = 17	 Three-dimensional reconstructions of thick tissue sections (lower back L1–L6) Fast Blue retrograde labeling (lower back muscle—DRG) and immunofluorescence with CGRP antibody 	• 60–88% DRG cells with terminations within the collagen matrix of connective tissue in the lowr back also expressed CGRP.
Barry et al., 2015 [56]	C57Bl/6 mouse, Naïve, 4–8 per group	 Immunohistochemistry: TLF were multiple-labeled using antibodies to the pan-neuronal marker neuron-specific enolase (NSE), and CGRP and SP Multiple-labeling immunofluorescence and retrograde axonal tracing 	 The TLF contained the same proportions of nerve fiber subpopulations found in back muscles. The TLF contained a higher density of sensory nerves, with three times more CGRP-immunoreactive fibers compared to back muscles (latissimus dorsi). However, around half of these lack SP-immunoreactivity.
Mense et al., 2016 [57]	 Rats, Naïve, n = 5 Fascia inflammation— CFA, n = 5 Dorsal root electrical stimulation, n = 4 	 Immunohistochemical antibodies to CGRP, SP, and TRPV1 Functional data Neurogenic plasma extravasation (Evans Blue) 	 In naïve rats, CGRP-immunopositive fibers were found in the outer and inner layer of TLF. SP-containing nerve fibers existed exclusively in the outer layer of TLF. In inflamed (CFA) rats, The CGRP-immunopositive fiber length increased significantly only in the deep lamina of the posterior TLF layer SP-positive structures were found in the same layer of TLF. In inflamed (electrical stimulation) rats, Neurogenic plasma extravasation existed in the form of dark patches of Evans blue in the TLF
Tesarz et al., 2011 [50]	 Rats, Naïve, n = 8 Specimens Humans TLF n = 3 	• Immunohistochemical antibodies to PGP 9.5, TH, CGRP, and SP	 In rats, Fibers immunoreactive to PGP 9.5, TH, CGRP, and SP were found in the layer adjacent to the subcutaneous tissue and the superficial lamina of the posterior TLF layer. In humans, The majority of peptidergic nerve endings were located in the subcutaneous tissue and in structures comparable with superficial and deep lamina of the posterior rat TLF layer.
Mense et al., 2019 [39]	 Rats, Naïve and Fascia inflammation— CFA, n = NI Specimens Humans TLF n = NI 	• Immunohistochemical antibodies to PGP 9.5, TH, CGRP, and SP	 In rats, Fibers immunoreactive to PGP 9.5, TH, CGRP, and SP were found in the TLF. The inflamed fascia exhibited a higher density of CGRP-immunoreactive and SP- immunoreactive units. In humans, Fibers immunoreactive to CGRP were the most frequent ones.

Table 1. Ex vivo studies.

Studies (Authors, Years)	Specie, Condition, n	Method	Main Findings
Marpalli et al., 2021 [58]	• Specimens Humans TLF <i>n</i> = 20	 Microscopy— Morphological morphometric study 	 The quantification of peripheral nerves and nociceptors were quantifiable in the deep lamina of TLF. The thickness of TLF and number of nerve endings in the sacral level was increased compared to that of thoracic vertebral levels.
Fede et al., 2021 [59]	C57Bl/6 mouse, Naïve, n = 7	 Immunohistochemical: TLF were multiple-labeled using antibodies to Tyrosine Hydroxylase, S100, and PGP Transmission electron microscopy 	• The TLF presented free nerve endings and autonomic innervation.

Note: CFA—complete Freund's adjuvant; CGRP—calcitonin gene-related peptide; DRG—dorsal root ganglia; SP—substance P; TLF—thoracolumbar fascia; TRPV1—transient receptor potential vanilloid 1—TH: tyrosine hydroxylase; NI—not informed.

Studies (Authors, Years)	Species, Condition, n	Method	Main Findings
Schilder et al., 2014 [42]	Healthy humans; Ultrasound-guided bolus injections of hypertonic saline into the erector spinae muscle, the thoracolumbar fascia (TLF, posterior layer), and the overlying subcutis; n = 6 women, n = 6 men	 Pressure pain threshold (algometer) Pain distribution (two-dimensional paper form body image) Pain quality (Pain Perception Scale, "Schmerzempfindungs- Skala" [SES]) 	 Hypertonic saline injected into the fascia resulted in longer pain duration and higher pain intensities than injections into subcutaneous tissue or muscle. Pain radiation and pain affect evoked by fascia injection exceeded those of the muscle and the subcutaneous tissue. Pain descriptors (burning, throbbing, and stinging) suggested innervation by both A- and C-fiber nociceptors.
Schilder et al., 2016 [43]	Healthy humans; Electrical stimulation with high-frequency pulses in the multifidus muscle and the overlying TLF through bipolar concentric needle electrodes placed at lumbar level (L3/L4); n = 8 women, n = 8 men	 Electrical detection threshold and pain threshold Pain distribution (two-dimensional paper form body image) Pain rating during HFS 	 Fascia vs muscle high-frequency stimulation (HFS): Electrical pain thresholds were lower and pain ratings were higher for fascia. For both tissues, pain ratings increased significantly. Fascia HFS increased fascia pain ratings 2.17 times compared with control site. Muscle HFS decreased pain sensitivity of the overlying fascia by 20%. Potentiation by fascia HFS was similar to that of skin HFS, followed over 60 min post-HFS.

Table 2. In vivo studies.

Table 1. Cont.

Studies (Authors, Years)	Species, Condition, <i>n</i>	Method	Main Findings
Schilder et al., 2018 [44]	Healthy humans, Electrical stimulation with high-frequency pulses in the multifidus muscle and the overlying TLF through bipolar concentric needle electrodes placed at lumbar level (L3/L4); n = 8 women, n = 8 men	 Pain quality (Pain Perception Scale, "Schmerzempfindungs- Skala" [SES]) 	 Factor analysis of the sensory descriptors revealed the following: Superficial thermal ("heat pain" identified by the items "burning", "scalding", and "hot") and superficial mechanical factors ("sharp pain" identified by the items "cutting", "tearing", and "stinging") were more pronounced for fascia than muscle. Deep pain (identified by the items "beating", "throbbing", and "pounding") was more pronounced for muscle than fascia
Hoheisel et al., 2011 [60]	Rats, Naïve, n = 12; Rats, Treated with CFA, n = 32	Systematic electrophysiological recordings were made from dorsal horn neurons in spinal (Th13–L5) to obtain information about the spinal nociceptive processing from the TLF.	 In naïve rats, 6–14% of the neurons in the spinal segments Th13–L2 had nociceptive input from the TLF. No neurons responsive to input from the TLF were found in segments In inflamed (multifidus) rats, There was a significant increase from 4% to 15% in the proportion of neurons responsive to input from the TLF. Neurons in spinal segment L3 responded to fascia input in animals.
Hoheisel et al., 2015 [61]	Rats, Intrafascial CFA injection, <i>n</i> = 25	Extracellular recordings were made from dorsal horn neurons in the lumbar segment L3, identification of receptive fields and behavioral experiments were performed.	 In inflamed (Intrafascial CFA injection) rats, 11.1% of neurons in the spinal segment L3 received input after TLF inflammation. Compared with control, the proportion of neurons having input from all deep somatic tissues rose from 10.8% to 33.3%. Moreover, many neurons acquired new deep receptive fields, most of which were located in the hindlimb. Although the pressure pain threshold of the inflamed rats did not change, they demonstrated a reduction in exploratory activity.

Table 2. Cont.

Note: CFA—complete Freund's adjuvant; TLF—thoracolumbar fascia; HFS—high-frequency stimulation.

2.4. Screening and Agreement

The research articles were reviewed and selected in two phases. Phase I consisted of screening titles and abstracts to include possible relevant studies and to exclude irrelevant studies. Phase II consisted of screening full texts of studies previously identified as possibly relevant to select eligible studies. Screenings in phases I and II were performed by two independent reviewers (L.S., M.A.) and any discrepancy in relation to the study's eligibility was mediated by a third reviewer (D.F.M., n = 2).

2.5. Step 4: Data Charting

The following data were extracted from eligible studies: (a) references; (b) animals, disease model; (c) method; (d) main results (Tables 1 and 2). The extraction parameters were defined jointly by two authors. Data extraction was performed by one author and verified by a second author to minimize any discrepancy.

2.6. Step 5: Collating, Summarizing, and Reporting the Results

The data were summarized descriptively according to the following items:

- Preclinical: including in vivo and ex vivo studies related to nociceptive investigation of TLF.
- ii. Clinical: including in vivo and ex vivo studies related to nociceptive investigation of TLF.

3. Results

3.1. Basic Numerical Analysis

The search of the database carried out on 30 June 2021 resulted in 258 articles. After the removal of duplicates, 214 articles had their titles and abstracts screened in Phase I, and those articles considered to be eligible for Phase II were screened. Fifty-eight articles were selected to be read in full, and of these, 48 were excluded due to failure to meet eligibility requirements. Thus, a total of 12 articles were included in this review, all of which were published prior to the year 2021. These 12 articles were divided into two groups: (1) ex vivo studies and (2) in vivo studies.

3.2. Ex Vivo Studies

A total of seven studies evaluated and quantified the nociceptive nerve fibers terminating within the nonspecialized connective tissues in the lower back. Specific immunohistochemistry assays included immunofluorescence (5/7), calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity (5/7), substance P (SP) immunoreactivity (4/7), and retrograde labeling (2/7). Species selected for ex vivo analysis included mice (2/5), rats (4/7), and humans (3/7). Anatomical structures analyzed included the TLF (7/7), lower back muscles (7/7), and DRG (2/7). Detailed information regarding the immunohistochemistry assay, species, and outcome measures utilized can be found in Table 1.

3.3. Nociceptive Innervation of TLF: Histological Evidence

A total of seven studies characterized the distribution of the nociceptive nerve fibers terminating within the TLF [39,50,55–59]. All these studies investigated whether fasciae associated with muscle are also innervated by peptidergic nociceptive sensory fibers. Collectively, these studies regarding "naïve" fascia (mice, rats, and human) reported the following: (a) 60–88% DRG cells with terminations within the collagen matrix of connective tissue in the lower back also expressed calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in rats [55]; (b) The TLF contained a higher density of sensory nerves, with three times more CGRP-immunoreactive fibers compared to back muscles (latissimus dorsi); however, around half of these lacked SP-immunoreactivity in mice [56], (c) CGRPimmunopositive fibers in the outer and inner layer of TLF and SP-containing nerve fibers existed exclusively in the outer layer of TLF in rats [57]; (d) in rats, fibers immunoreactive to protein gene product (PGP) 9.5, tyrosine hydroxylase (TH), CGRP, and SP were found in the subcutaneous tissue and the superficial lamina of the posterior TLF layer, and in humans, the majority of peptidergic nerve endings were located in the subcutaneous tissue and in structures comparable with superficial lamina and deep lamina of the posterior rat TLF layer [50]. Two studies investigated nociceptive-related responses to experimental irritation of the TLF, which resulted in the following: (a) in rats with CFA injections made in the spinous processes L4 and L5, the CGRP-immunopositive fiber length increased significantly only in the inner layer of TLF and SP-positive structures were found in the deep lamina of the posterior TLF layer [57]; (b) in rats, inflammation was induced by electrically stimulating the dorsal roots L3–L6 at an intensity supramaximal for unmyelinated fibers. Specifically, SP and CGRP are known to cause plasma extravasation by increasing the permeability of capillaries close to the endings. Neurogenic plasma extravasation in the form of dark patches of Evans blue in the TLF were observed [57].

3.4. In Vivo Studies

A total of five studies evaluated and quantified nociceptive outcomes after electrical and chemical stimulation of the TLF relating to its contribution to LBP [42–44,49,50]. Of

these five studies, two investigated the role of chemical (3/5) and electrical (2/5) irritation of the TLF on measures related to nociceptive innervation of the lower back as a potential source of LBP. Specific outcomes included electrophysiological recordings from dorsal horn neurons in spinal (2/5), pressure pain threshold (algometer) (2/5), pain distribution (1/5), pain quality (1/5), and electrical detection threshold (1/5). Two studies made systematic recordings from dorsal horn neurons in the spinal cord to obtain information about the spinal nociceptive processing from the TLF in naïve rats. Species selected for in vivo analysis included rats (2/5) and humans (3/5). Anatomical site of analysis included the TLF (5/5), lower back muscles (5/5), and dorsal horn neurons in spinal (2/5). Detailed information regarding the species and outcome measures can be found in Table 2.

3.5. Nociceptive Innervation of TLF: Functional Evidence

A total of five studies evaluated the role the nociceptive input through electrical and chemical stimulation of the TLF in relation to LBP [42–44,60,61]. Of these five studies, three investigated the role of chemical irritation of the TLF on measures related to nociceptive innervation of the lower back as a potential source of LBP. These studies regarding chemical irritation of fascia (in rats and humans) reported the following: (a) in rats with bilateral complete Freund's adjuvant (CFA) [60] with injections made in the spinous processes L4 and L5 or intrafascial (L3) [61], there was a significant increase from 4% to 15% in the proportion of neurons responsive to input from the TLF and neurons in the L3 spinal segment that did not receive input from the fascia in control animals; (b) healthy volunteers received ultrasound-guided bolus injections of hypertonic saline into the erector spinae muscle, in the deep lamina of the posterior TLF layer, and the overlying subcutis. Hypertonic saline injections into the TLF resulted in longer pain duration and higher pain intensities than injections into subcutaneous tissue or muscle. Pain radiation and pain affect evoked by fascia injections exceeded those of the muscle and the subcutaneous tissue. Pain descriptors (burning, throbbing, and stinging) suggested innervation by both A- and C-fiber nociceptors [42].

Two studies [43,44] used electrical stimulation with high-frequency pulses in the multifidus muscle and the overlying TLF through bipolar concentric needle electrodes placed at lumbar level (L3/L4) to assess distinct differences between nociceptive innervation of lower back fascia and muscles in humans. These studies reported the following: (a) lower electrical pain thresholds and higher pain ratings for fascia for both tissues. Fascia highfrequency stimulation increased fascia pain ratings 2.17 times compared to control; muscle high frequency stimulation (HFS) decreased pain sensitivity of the overlying fascia by 20%; potentiation by fascia HFS was similar to that of skin HFS, followed over 60 min post-HFS [43]; (b) Factor analysis of the sensory descriptors revealed that superficial thermal and superficial mechanical factors were more pronounced for fascia than muscle, whereas deep pain was more pronounced for muscle than fascia [44].

4. Discussion

The main objective of this scoping review was to assess current knowledge regarding nociceptive innervation of the TLF to better inform future mechanistic and clinical TLF research targeting LBP treatment. The results observed here, from a collective compilation and evaluation of studies on TLF nociceptive innervation, demonstrate that rodents and humans have an important nociceptive afferent TLF innervation and that the stimulation of this structure can lead to a central sensitization process in the long term. In this sense, these findings support the idea—through neurophysiological substrates related to nociceptive innervation—that TLF may be, at least in part, the origin of LBP. Although we recognize that the sensory innervation of the TLF encompasses proprioceptive, autonomic, and nociceptive components, here, we focus on nociception as a direct cause of pain. In that regard, articles for this review were restricted to preclinical and clinical including ex vivo (n = 7) and in vivo (n = 5) studies related to nociceptive investigation of TLF.

4.1. Ex Vivo Studies

Ex vivo studies were constituted primarily of specific immunohistochemistry assays to neuropeptides [39,50,55–57]. Mice [56], rats [39,50,55–57], and humans [50,57] presented positive immunoreactivity to SP and CGRP in the TLF, a nonspecialized connective tissue in the lower back [51]. Furthermore, functional evidence confirmed the hypothesis of nociceptive innervation of TLF, since the chemical irritation of the fascia by local injection of CFA significantly increased SP- and CGRP-immunopositive fiber in the deep lamina of the posterior TLF layer. In addition, electrical stimulation of the dorsal lumbar roots at an intensity for unmyelinated fibers increased the permeability of capillaries close to the endings, causing neurogenic plasma extravasation, a phenomenon known to be caused by SP and CGRP [57]. DRG neurons traced from the collagen matrix of connective tissue in the lower back support the finding that populations of CGRP-immunoreactive fibers innervate the TLF [55,56]. Innervation density was higher in the TLF compared to muscles of the back, supporting the view that the TLF may make an under-recognized contribution to chronic back pain.

4.2. In Vivo Studies

In vivo and functional studies were constituted primarily of articles that evaluated nociceptive outcomes after chemical [42] and electrical [43,44] stimulation of the TLF relating to its contribution to LBP. In humans, the pain evoked by ultrasound-guided bolus injection of hypertonic saline [42] or electrical stimulation [43] in TLF tissue exceeded those of muscle. Furthermore, the pain after chemical stimulation of TLF was described by the patients in rather extreme terms such as cutting, tearing, and stinging, which suggests innervation by both A- and C-fiber nociceptors [42,62,63]. In contrast, muscle-derived pain was predominantly attributed to sensory qualities like throbbing and pounding [44]. It is understood that C- and A-cutaneous afferents correlate with group IV and III muscle afferents [62]. However, the fact that muscle-associated pain differs from cutaneous-associated pain strongly suggests that the neurophysiological mechanisms are not similar. Studies have suggested the term fasciatome for segmental innervation deep fascia which helps to differentiate between pain of cutaneous origin and pain of muscular origin [50,51,64]. Unlike the dermatome, which represents the portion of tissue composed of skin, hypodermis, and superficial fascia supplied by all cutaneous branches of an individual spinal nerve, the fasciatome is the portion of the deep fascia supplied by the same nerve root and organized along lines of force to emphasize the main directions of movement. When the dermatome is altered, it signals the location of pain, while the fasciatome demonstrates pain irradiation through the organization of the fascial anatomy [50,51,64]. This is evident when electrical stimulation of the muscle nerves produces only a single pain, as opposed to electrical stimulation of the cutaneous nerves which presents pain in two phases [63]. Corroborating the findings of our scoping review, it has been previously described that fascial pain quality is different, as cutaneous pain is well localized and described as stabbing, burning, or cutting, while muscle pain tends to be referred to and described as tearing, cramping, or pressing [63]. Finally, electrophysiological recordings from dorsal horn neurons in spinal cord rats showed that the nociception evoked by the injection of a chemical irritant in the lumbar spinous process increased the proportion of neurons responsive to input from TLF and neurons in the L3 spinal segment that previously did not respond to input from the fascia in naive animals [60]. Interestingly, this study also showed that most dorsal horn neurons that receive nociceptive input from the TLF are convergent and have additional input from other tissues, such as skin and lumbar muscles, at least in rats [60]. The nociceptors located in the fascia are possibly the beginning of the nociceptive pathway from the lumbar region soft tissue to the spinal dorsal horn and to other central locations from there. Since input from all soft tissues of the lower back converge onto the same dorsal horn neurons, no separate pathway from fascia to higher centers appears to exist. This may be the explanation for why a pain from the TLF is difficult to distinguish from the pain from other soft tissues of the lower back [60,61]. Hoheisel et al. (2015) [61] made an intrafascial

CFA injection in the TLF and registered dorsal horn neuron activity in the lumbar segment L3. They observed that the proportion of neurons with input from all deep somatic tissues rose from 10.8% to 33.3% when compared with control. One of the most relevant findings in animals with fasciitis was the appearance of new receptive fields in deep somatic tissues beyond the fascia, located outside the lumbar region and extending to the distal hindlimb. The appearance of new receptive fields could be a possible explanation for the spread of pain in patients with LBP.

4.3. Limitations

Limitations associated with this scoping review include selecting publications in English only and free full text publications, which could potentially reduce the number of studies being retrieved from the literature search.

4.4. Clinical Perspectives and Future Directions

Published guidelines have proposed non-pharmacological approaches such as exercise and physical therapy (massage, acupuncture, spinal manipulative therapy) as first-line treatments for lower back pain primarily due to concerns about the risk–benefit ratio of opioids and suboptimal opioid-related results in clinical trials [65–67]. A major gap in LBP research includes the contribution of musculoskeletal tissues (unspecialized muscles and connective tissues) in the lower back of the spine [68]. Although not well understood, the pathophysiology of non-specialized connective tissues, their relationship to LBP, and other conditions of chronic musculoskeletal pain can include fibrosis, chronic inflammation and neuroplastic changes, such as altered sensitivity [69–73]. Thus, the results of the present study highlight the role of connective tissue innervation in the development of lower back pain by demonstrating the presence of sensory nerve fiber endings within the collagen matrix of non-specialized connective tissue, and that structural innervation of these connective tissues is important for functional changes associated with neurogenic inflammation and persistent pain. Based on the results of this review, it is suggested that the treatment of TLF should also be considered in LBP therapeutic approaches.

Despite the recent increase in the number of basic scientific investigations describing the nociceptive innervation of TLF, this review has identified numerous areas that require further study to advance the field and deepen our understanding of the fascia approach. Although peripheral evidence exists and provides strong evidence for neurophysiological substrates of the nociceptive innervation of the fascia, there is limited evidence related to the central (supra-spinal) mechanisms involved. Future preclinical studies related to techniques aimed towards treatment (i.e., manipulation/mobilization) of TLF mimicking the clinical setting could be useful to advance knowledge and help with the treatment of musculoskeletal pain. In this sense, preclinical studies that record the results immediately after (or shortly thereafter) the delivery of fascial manipulation, long-term or longitudinal studies, and studies that investigate the physiological impact of different fascial manipulation dosage are needed. As in the study of França et al., 2020 [74], preclinical studies are just beginning to recognize and demonstrate that analgesic modulation related to fascial manipulation involves complex mechanistic interactions. Thus, preclinical studies that investigate endogenous neurological systems such as endogenous opioids [75], endocannabinoids [76], adenosinergic system [77], and/or neuroimmune contributions [74,78] are needed, and these effects may require that certain fascial manipulation dosage thresholds be achieved. Preclinical studies investigating the effects of fascial manipulation on gene expression, neurotransmitter/neuropeptide/cytokine release, mechanosensitive ion channel activation, neuroimmune response, global cortical/spinal circuit connectivity, and descending inhibition [77,78] are needed to advance the manual therapy field and deepen our understanding of fascial manipulation.

5. Conclusions

While more studies are clearly needed, findings from this review based on histological, immunohistochemical, electrophysiological, behavioral, and clinical evidence support the view that the TLF potentially plays a major role in clinical LBP, or at least makes significant contribution.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10 .3390/jcm10194342/s1, Data Sheet S1: PRISMA-ScR; Data Sheet S2: search strategy.

Author Contributions: Conceptualization, L.S. and D.F.M.; methodology, M.d.S.A., M.E.O., E.B.B., F.C.d.S., V.V.H., R.S., L.M.-M. and W.R.R.; validation, M.d.S.A., M.E.O., E.B.B., G.B., F.C.d.S. and V.V.H.; formal analysis, R.S. and W.R.R.; data curation, M.d.S.A., M.E.O., E.B.B., G.B., F.C.d.S., V.V.H., R.S. and W.R.R.; writing—original draft preparation, D.F.M., L.S., L.M.-M. and W.R.R.; writing—review and editing, D.F.M., L.S. and W.R.R.; supervision, D.F.M.; Linguistic revision, E.B.B., G.B., R.S. and W.R.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). Daniel Fernandes Martins is supported by research fellowships from CNPq (310128/2020-0).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ASICs	acid-sensing ion channels
CFA	complete Freund's adjuvant
CGRP	calcitonin gene-related peptide
DRG	dorsal root ganglia
GDNF	glial-derived neurotrophic factor
HFS	high-frequency stimulation
LBP	low back pain
MSK	musculoskeletal
NGF	nerve growth factor
NSE	neuron-specific enolase
PGP	protein gene product 9.5
SP	substance P
TH	tyrosine hydroxylase
TLF	thoracolumbar fascia
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1
TRPM8	transient receptor potential cation channel subfamily M member 8
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
WHO	World Health Organization

References

- 1. Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001, 413, 203–210. [CrossRef]
- Basbaum, A.I.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009, 139, 267–284. [CrossRef]
- 3. Loeser, J.D.; Treede, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. Pain 2008, 137, 473–477. [CrossRef]
- Meyer, R.A.; Ringkamp, M.; Campbell, J.N.; Raja, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In Wall and Melzack's Textbook of Pain; McMahon, S.B., Koltzenburg, M., Eds.; Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2008; pp. 3–34.
- Basbaum, A.I.; Jessell, T. The Perception of Pain. In *Principles of Neuroscience*; Kandel, E.R., Schwartz, J., Jessell, T., Eds.; Appleton and Lange: New York, NY, USA, 2000; pp. 472–491.
- 6. Woolf, C.J.; Ma, Q. Nociceptors–noxious stimulus detectors. *Neuron* 2007, 55, 353–364. [CrossRef]

- 7. Riedel, W.; Neeck, G. Nociception, pain, and antinociception: Current concepts. Z. Rheumatol. 2001, 60, 404–415. [CrossRef]
- 8. Lee, G.I.; Neumeister, M.W. Pain: Pathways and Physiology. Clin. Plast. Surg. 2020, 47, 173–180. [CrossRef]
- Bourne, S.; Machado, A.G.; Nagel, S.J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 2014, 25, 629–638. [CrossRef] [PubMed]
- 10. Kuner, R.; Kuner, T. Cellular Circuits in the Brain and Their Modulation in Acute and Chronic Pain. *Physiol. Rev.* 2021, 101, 213–258. [CrossRef]
- 11. Schmidt, R.; Schmelz, M.; Forster, C.; Ringkamp, M.; Torebjork, E.; Handwerker, H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 333–341. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Seifert, O.; Baerwald, C. Interaction of pain and chronic inflammation. Z. Rheumatol. 2021, 80, 205–213. [CrossRef] [PubMed]
- 13. de Magalhães, S.F.; Manzo, L.P.; de Faria, F.M.; de Oliveira-Fusaro, M.C.; Nishijima, C.M.; Vieira, W.F.; Bonet, I.J.M.; Dos Santos, G.G.; Tambeli, C.H.; Parada, C.A. Inflammatory pain in peripheral tissue depends on the activation of the TNF-alpha type 1 receptor in the primary afferent neuron. *Eur. J. Neurosci.* **2021**, *53*, 376–389. [CrossRef] [PubMed]
- 14. Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **1997**, *6653*, 816–824. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Olausson, H.; Cole, J.; Rylander, K.; McGlone, F.; Lamarre, Y.; Wallin, B.G.; Vallbo, Å. Functional role of unmyelinated tactile afferents in human hairy skin: Sympathetic response and perceptual localization. *Exp. Brain Res.* **2008**, *184*, 135–140. [CrossRef]
- 16. Snider, W.D.; McMahon, S.B. Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. *Neuron* **1998**, *20*, 629–632. [CrossRef]
- 17. Dong, X.; Han, S.; Zylka, M.J.; Simon, M.I.; Anderson, D.J. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* **2001**, *106*, 619–632. [CrossRef]
- 18. Brain, S.D.; Williams, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* **1985**, *86*, 855–860. [CrossRef] [PubMed]
- 19. Nakamura-Craig, M.; Gill, B.K. Effect of neurokinin A, substance P and calcitonin gene related peptide in peripheral hyperalgesia in the rat paw. *Neurosci. Lett.* **1991**, *124*, 49–51. [CrossRef]
- Shi, X.; Wang, L.; Li, X.; Sahbaie, P.; Kingery, W.S.; Clark, J.D. Neuropeptides contribute to peripheral nociceptive sensitization by regulating interleukin-1 beta production in keratinocytes. *Anesth. Analg.* 2011, 113, 175–183. [CrossRef]
- 21. Seybold, V.S. The role of peptides in central sensitization. Handb. Exp. Pharmacol. 2009, 194, 451–491. [CrossRef]
- 22. Le Greves, P.; Nyberg, F.; Terenius, L.; Hökfelt, T. Calcitonin gene-related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *115*, 309–311. [CrossRef]
- 23. Yu, Y.; Lundeberg, T.; Yu, L.C. Role of calcitonin gene-related peptide and its antagonist on the evoked discharge frequency of wide dynamic range neurons in the dorsal horn of the spinal cord in rats. *Regul. Pept.* **2002**, *103*, 23–27. [CrossRef]
- 24. Sun, R.Q.; Lawand, N.B.; Lin, Q.; Willis, W.D. Role of calcitonin gene-related peptide in the sensitization of dorsal horn neurons to mechanical stimulation after intradermal injection of capsaicin. *J. Neurophysiol.* **2004**, *92*, 320–326. [CrossRef] [PubMed]
- 25. WHO. *Musculoskeletal Conditions*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021; Available online: https://www.who. int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions (accessed on 5 June 2021).
- 26. Elma, Ö.; Yilmaz, S.T.; Deliens, T.; Clarys, P.; Nijs, J.; Coppieters, I.; Polli, A.; Malfliet, A. Chronic Musculoskeletal Pain and Nutrition: Where Are We and Where Are We Heading? *PM R* **2020**, *12*, 1268–1278. [CrossRef]
- Graven-Nielsen, T.; Arendt-Nielsen, L. Assessment of mechanisms in localized and widespread musculoskeletal pain. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010, 6, 599–606. [CrossRef]
- 28. Sanzarello, I.; Merlini, L.; Rosa, M.A.; Perrone, M.; Frugiuele, J.; Borghi, R.; Faldini, C. Central sensitization in chronic low back pain: A narrative review. *J. Back Musculoskelet. Rehabil.* **2016**, *29*, 625–633. [CrossRef]
- 29. Shraim, M.A.; Massé-Alarie, H.; Hall, L.M.; Hodges, P.W. Systematic Review and Synthesis of Mechanism-based Classification Systems for Pain Experienced in the Musculoskeletal System. *Clin. J. Pain* **2020**, *36*, 793–812. [CrossRef]
- Queme, L.F.; Jankowski, M.P. Sex differences and mechanisms of muscle pain. Curr. Opin. Physiol. 2019, 11, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
- 31. Smith, E.; Hoy, D.G.; Cross, M.; Vos, T.; Naghavi, M.; Buchbinder, R.; March, L. The global burden of other musculoskeletal disorders: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 1323–1330. [CrossRef] [PubMed]
- 32. Bove, G.M.; Light, A.R. Calcitonin gene-related peptide and peripherin immunoreactivity in nerve sheaths. *Somatosens. Mot. Res.* **1995**, *12*, 49–57. [CrossRef]
- 33. Danielson, P.; Alfredson, H.; Forsgren, S. Distribution of general (PGP 9.5) and sensory (substance P/CGRP) innervations in the human patellar tendon. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **2006**, *14*, 125–132. [CrossRef]
- Saxler, G.; Löer, F.; Skumavc, M.; Pförtner, J.; Hanesch, U. Localization of SP-and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties. *Eur. J. Pain* 2007, *11*, 67. [CrossRef]
- Russo, M.; Deckers, K.; Eldabe, S.; Kiesel, K.; Gilligan, C.; Vieceli, J.; Crosby, P. Muscle Control and Non-specific Chronic Low Back Pain. *Neuromodul. Technol. Neural Interface* 2018, 21, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
- 36. Rio, E.; Moseley, L.; Purdam, C.; Samiric, T.; Kidgell, D.; Pearce, A.J.; Jaberzadeh, S.; Cook, J. The pain of tendinopathy: Physiological or pathophysiological? *Sports Med.* **2014**, *44*, 9–23. [CrossRef]
- 37. Grässel, S.; Muschter, D. Peripheral Nerve Fibers and Their Neurotransmitters in Osteoarthritis Pathology. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 931. [CrossRef]

- 38. Grässel, S.G. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, 485. [CrossRef]
- 39. Mense, S. Innervation of the thoracolumbar fascia. Eur. J. Transl. Myol. 2019, 29, 8297. [CrossRef] [PubMed]
- 40. Klingler, W.; Velders, M.; Hoppe, K.; Pedro, M.; Schleip, R. Clinical relevance of fascial tissue and dysfunctions. *Curr. Pain Headache Rep.* **2014**, *18*, 1–7. [CrossRef]
- 41. Gibson, W.; Arendt-Nielsen, L.; Taguchi, T.; Mizumura, K.; Graven-Nielsen, T. Increased pain from muscle fascia following eccentric exercise: Animal and human findings. *Exp. Brain Res.* **2009**, *194*, 299–308. [CrossRef] [PubMed]
- 42. Schilder, A.; Hoheisel, U.; Magerl, W.; Benrath, J.; Klein, T.; Treede, R.D. Sensory findings after stimulation of the thoracolumbar fascia with hypertonic saline suggest its contribution to low back pain. *Pain* **2014**, *155*, 222–231. [CrossRef]
- 43. Schilder, A.; Magerl, W.; Hoheisel, U.; Klein, T.; Treede, R.D. Electrical high-frequency stimulation of the human thoracolumbar fascia evokes long-term potentiation-like pain amplification. *Pain* **2016**, *157*, 2309–2317. [CrossRef]
- 44. Schilder, A.; Magerl, W.; Klein, T.; Treede, R.D. Assessment of pain quality reveals distinct differences between nociceptive innervation of low back fascia and muscle in humans. *Pain Rep.* **2018**, *3*, e662. [CrossRef] [PubMed]
- Tesh, K.M.; Dunn, J.S.; Evans, J.H. The abdominal muscles and vertebral stability. *Spine* 1987, *12*, 501–508. [CrossRef] [PubMed]
 Barker, P.J.; Urquhart, D.M.; Story, I.H.; Fahrer, M.; Briggs, C.A. The middle layer of lumbar fascia and attachments to lumbar
- transverse processes: Implications for segmental control and fracture. *Eur. Spine J.* **2007**, *16*, 2232–2237. [CrossRef] [PubMed]
- 47. Barker, P.J.; Hapuarachchi, K.S.; Ross, J.A.; Sambaiew, E.; Ranger, T.A.; Briggs, C.A. Anatomy and biomechanics of gluteus maximus and the thoracolumbar fascia at the sacroiliac joint. *Clin. Anat.* **2014**, 27, 234–240. [CrossRef] [PubMed]
- Langevin, H.M.; Fox, J.R.; Koptiuch, C.; Badger, G.J.; Greenan-Naumann, A.C.; Bouffard, N.A.; Konofagou, E.E.; Lee, W.N.; Triano, J.J.; Henry, S.M. Reduced thoracolumbar fascia shear strain in human chronic low back pain. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2011, 12, 203. [CrossRef]
- 49. Fan, C.; Fede, C.; Gaudreault, N.; Porzionato, A.; Macchi, V.; de Caro, R.; Stecco, C. Anatomical and functional relationships between external abdominal oblique muscle and posterior layer of thoracolumbar fascia. *Clin. Anat.* 2018, 7, 1092–1098. [CrossRef]
- 50. Tesarz, J.; Hoheisel, U.; Wiedenhöfer, B.; Mense, S. Sensory innervation of the thoracolumbar fascia in rats and humans. *Neuroscience* **2011**, *194*, 302–308. [CrossRef]
- 51. Willard, F.H.; Vleeming, A.; Schuenke, M.D.; Danneels, L.; Schleip, R. The thoracolumbar fascia: Anatomy, function and clinical considerations. *J. Anat.* 2012, 221, 507–536. [CrossRef]
- 52. Abe, H.; Hayashi, S.; Kim, J.H.; Murakami, G.; Rodríguez-Vázquez, J.F.; Jin, Z.W. Fetal development of the thoracolumbar fascia with special reference to the fascial connection with the transversus abdominis, latissimus dorsi, and serratus posterior inferior muscles. *Surg. Radiol. Anat.* 2021, *43*, 917. [CrossRef] [PubMed]
- 53. Vleeming, A.; Pool-Goudzwaard, A.L.; Stoeckart, R.; van Wingerden, J.P.; Snijders, C.J. The posterior layer of the thoracolumbar fascia. Its function in load transfer from spine to legs. *Spine* **1995**, *20*, 753–758. [CrossRef]
- 54. Arksey, H.; O'Malley, L. Scoping studies: Towards a methodological framework. *Int. J. Soc. Res. Methodol.* 2005, *8*, 19–32. [CrossRef]
- 55. Corey, S.M.; Vizzard, M.A.; Badger, G.J.; Langevin, H.M. Sensory innervation of the nonspecialized connective tissues in the low back of the rat. *Cells Tissues Organs* **2011**, *194*, 521–530. [CrossRef] [PubMed]
- Barry, C.M.; Kestell, G.; Gillan, M.; Haberberger, R.V.; Gibbins, I.L. Sensory nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide in gastrocnemius, latissimus dorsi and erector spinae muscles and thoracolumbar fascia in mice. *Neuroscience* 2015, 291, 106–117. [CrossRef]
- 57. Mense, S.; Hoheisel, U. Evidence for the existence of nociceptors in rat thoracolumbar fascia. J. Bodyw. Mov. Ther. 2016, 20, 623–628. [CrossRef]
- 58. Marpalli, S.; Mohandas Rao, K.G.; Venkatesan, P.; George, B.M. The morphological and microscopical characteristics of posterior layer of human thoracolumbar fascia; A potential source of low back pain. *Morphologie* **2021**, *9*. [CrossRef]
- 59. Fede, C.; Petrelli, L.; Guidolin, D.; Porzionato, A.; Pirri, C.; Fan, C.; de Caro, R.; Stecco, C. Evidence of a new hidden neural network into deep fasciae. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–11. [CrossRef]
- 60. Hoheisel, U.; Taguchi, T.; Treede, R.D.; Mense, S. Nociceptive input from the rat thoracolumbar fascia to lumbar dorsal horn neurones. *Eur. J. Pain* **2011**, *15*, 810–815. [CrossRef] [PubMed]
- 61. Hoheisel, U.; Mense, S. Inflammation of the thoracolumbar fascia excites and sensitizes rat dorsal horn neurons. *Eur. J. Pain* **2015**, *19*, 419–428. [CrossRef] [PubMed]
- 62. Mense, S. Peripheral mechanisms of muscle pain: Response behavious of muscle nociceptors and factors eliciting local muscle pain. In *Muscle Pain: Understanding the Mechanisms*; Mense, S., Gerwin, G., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 49–103.
- 63. Mense, S. Muscle pain: Mechanisms and clinical significance. Dtsch. Aerzteblatt Online 2008, 105, 214–219. [CrossRef]
- 64. Stecco, C.; Pirri, C.; Fede, C.; Fan, C.; Giordani, F.; Stecco, L.; Foti, C.; de Caro, R. Dermatome and fasciatome. *Clin. Anat.* 2019, 32, 896–902. [CrossRef]
- Ketenci, A.; Zure, M. Pharmacological and non-pharmacological treatment approaches to chronic lumbar back pain. *Turk. J. Phys. Med. Rehabil.* 2021, 67, 1–10. [CrossRef] [PubMed]

- 66. Hartvigsen, J.; Hancock, M.J.; Kongsted, A.; Louw, Q.; Ferreira, M.L.; Genevay, S.; Hoy, D.; Karppinen, J.; Pransky, G.; Sieper, J.; et al. Lancet Low Back Pain Series Working Group. What low back pain is and why we need to pay attention. *Lancet* **2018**, *391*, 2356–2367. [CrossRef]
- 67. Knezevic, N.N.; Candido, K.D.; Vlaeyen, J.W.S.; Van Zundert, J.; Cohen, S.P. Low back pain. Lancet 2021, 398, 78–92. [CrossRef]
- 68. Casato, G.; Stecco, C.; Busin, R. Role of fasciae in nonspecific low back pain. *Eur. J. Transl. Myol.* **2019**, *29*, 8330. [CrossRef] [PubMed]
- 69. Langevin, H.M.; Sherman, K.J. Pathophysiological model for chronic low back pain integrating connective tissue and nervous system mechanisms. *Med. Hypotheses* 2007, *68*, 74–80. [CrossRef] [PubMed]
- 70. Videman, T. Connective tissue and immobilization. Key factors in musculoskeletal degeneration? *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1987**, 221, 26–32.
- 71. Koltzenburg, M. The changing sensitivity in the life of the nociceptor. Pain 1999, 82, S93–S102. [CrossRef]
- 72. Waldmann, R.; Champigny, G.; Bassilana, F.; Heurteaux, C.; Lazdunski, M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* **1997**, *386*, 173–177. [CrossRef]
- 73. Ansel, J.C.; Kaynard, A.H.; Armstrong, C.A.; Olerud, J.; Bunnett, N.; Payan, D. Skin-nervous system interactions. J. Investig. Dermatol. 1996, 106, 198–204. [CrossRef]
- 74. França, M.E.D.; Sinhorim, L.; Martins, D.F.; Schleip, R.; Machado-Pereira, N.A.; de Souza, G.M.; Santos, G.M. Manipulation of the Fascial System Applied During Acute Inflammation of the Connective Tissue of the Thoracolumbar Region Affects Transforming Growth Factor-β1 and Interleukin-4 Levels: Experimental Study in Mice. *Front. Physiol.* 2020, *11*, 1517. [CrossRef]
- Martins, D.F.; Bobinski, F.; Mazzardo-Martins, L.; Cidral-Filho, F.J.; Nascimento, F.P.; Gadotti, V.M.; Santos, A.R. Ankle joint mobilization decreases hypersensitivity by activation of peripheral opioid receptors in a mouse model of postoperative pain. *Pain Med.* 2012, 13, 1049–1058. [CrossRef] [PubMed]
- 76. Martins, D.F.; Mazzardo-Martins, L.; Cidral-Filho, F.J.; Gadotti, V.M.; Santos, A.R.S. Peripheral and spinal activation of cannabinoid receptors by joint mobilization alleviates postoperative pain in mice. *Neuroscience* **2013**, 255, 110–121. [CrossRef]
- Martins, D.F.; Mazzardo-Martins, L.; Gadotti, V.M.; Nascimento, F.P.; Lima, D.A.; Speckhann, B.; Santos, A.R. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. *Pain* 2011, 152, 2653–2661. [CrossRef] [PubMed]
- 78. Martins, D.F.; Mazzardo-Martins, L.; Cidral-Filho, F.J.; Stramosk, J.; Santos, A.R. Ankle joint mobilization affects postoperative pain through peripheral and central adenosine A1 receptors. *Phys. Ther.* **2013**, *93*, 401–412. [CrossRef] [PubMed]

88

4.2 ARTIGO 2

Esse artigo será submetido para a revista *Neuroscience*. O fator de impacto da revista é 3.708 e na área de Medicina II é Qualis/CAPES A2. O artigo está formatado, conforme as normas da revista neste link:

https://www.elsevier.com/journals/neuroscience/0306-4522/guide-for-authors

Manipulation of the fascial system applied to the thoracolumbar fascia reduces hyperalgesia through activation opioid and cannabinoid receptor in mice with paw inflammation

Larissa Sinhorim^{a,b}; Bruna H. de Oliveira^a; Maria E. Ortiz^a; Rafaela H. da Silva^a;

Gabriel M. de Souza^a; Yuri Szeremeta^a; Mayane dos S. Amorim^b; Maria E. D.

França^b; Edsel B. Bittencourt^{a,c}; Gianluca Bianco^{a,d}; André B. Hirayama^e;

Robert Schleip^{f,g}; Verônica V. Horewicz^a; Daniel F. Martins^{a*}

^aExperimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Brazil
^bSanta Catarina State University, College of Health Sciences and Sport, Posture and Balance Laboratory (Lapeq) – Brazil
^cCoastal Health Institute, Jacksonville, FL 32224, USA
^dIstituto di Formazione in Agopuntura e Neuromodulazione IFAN, 00147 Roma, Italy
^eDivision of Pathological Anatomy, Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of São Paulo
^fDepartment of Sport and Health Sciences, Technical University of Munich, 80799 Munich, Germany
^gDepartment for Medical Professions, DIPLOMA University of Applied Sciences, 37242 Bad Sooden-Allendorf, Germany

*Corresponding author:

Daniel F. Martins, PhD, Experimental Neuroscience Laboratory, Post-Graduate Program of Health Science, Southern University of Santa Catarina, Campus Grande Florianópolis, Palhoça, Santa Catarina, Brazil. Phone: +55 48 3279-1167; E-mail daniel.f.martins@institutoanimaeducacao.org.br

Abbreviations

MFS, manipulation fascial system; FTL, thoracolumbar fascia; CFA, Complete Freund's adjuvant; opioid- μ , receptor Mi; CB₂-R, Receptor canabinoide 2; IL-6, Interleukin 6; IL-10, Interleukin 10; IL-1 β , Interleukin 1 β , i.f., Intrafascial, i.pl., Intraplantar; i.t., Intrathecal; μ m, micrograms; μ l, microliters; ANOVA, analysis of variance.

Abstract

Introduction: Physiotherapists use manual interventions targeting the fascial system to treat musculoskeletal dysfunction and pain, but the endogenous mechanisms of analgesic effect has not been investigated.

Objective: To evaluate the role of opioid and cannabinoid receptors in the antihyperalgesic effect produced by the manipulation of the fascial system (MFS) applied to the thoracolumbar fascia (TLF) in an animal model of paw inflammation.

Methods: Mice injected with Complete Freund's Adjuvant (CFA) and treated with MFS underwent behavioral, i.e. mechanical hyperalgesia and edema. Additionally, mice were pretreated with lidocaine, naloxone or AM630 by different routes and mechanical hyperalgesia was assessed. Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and IL-10 concentration were determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. The immunocontent of CB₂ and *mu*-opioid receptors were identified using the Western Blotting technique.

Results: MFS reduced mechanical hyperalgesia induced by CFA injection. MFS did not reduce paw edema, neither influenced the levels of cytokines. The preadministration lidocaine, naloxone or AM630 prevented MFS analgesic effect in all routes. Finally, MFS treatment significantly altered the immunocontent opioid- μ receptor, CB₂R and activate fibroblasts in the TLF.

Conclusion: These data contribute to the understanding of the neurobiological mechanisms involved in the therapeutic effect of MFS as well as provides additional support for its use in the treatment of painful inflammatory conditions.

Descriptors: Endogenous mediator, Inflammatory pain, Fascia, Manual therapy.

INTRODUCTION

Considered a public health problem that generates expenses, nociceptive pain of inflammatory origin is the most common condition in rehabilitation centers¹. Reduction in work capacity, increased consumption of drugs, compromised quality of life and their interaction with family members and society, are some of the consequences presented by these individuals^{2,3,4}. Currently, the main tool for the treatment of this condition remains the use of medication⁵. However, opioids (the most used), for example, can cause dependence and debilitating side effects⁶. Some integrative therapies, physical exercises and manual techniques have been standing out within the scientific field (pre-clinical, clinical and systematic reviews) and especially in rehabilitation centers with promising results in the treatment of pain and its consequences, without side effects.⁷⁻¹⁴.

The effect of mechanical forces on the human body (used in manual techniques, for example) is a topic of great interest both for scientists who study the neural systems involved in mechanosensitization and for clinicians who use manipulations based on mechanical forces with the objective of to treat the pain^{11,15}. Pain can be modulated/controlled by activating neural systems of endogenous control, especially the opioid and cannabinoid systems¹⁰. Recently, it was found in the thoracolumbar fascia (TLF) of humans the expression of receptors CB₁ e CB₂¹⁶. Opioidergic and cannabinoid neurons interact with different cell types such as keratinocytes¹⁷, fibroblasts¹⁸, between others¹⁷, which suggests a possible role of these endogenous systems in the analgesic effect of these manual techniques¹⁹. Thus, as fascia is basically made up of innervated

connective tissue²⁰ and can thus naturally be stimulated through mechanical loads²¹, its role in endogenous pain modulation is supported.

The opioid and cannabinoid systems are central agents in this process and their involvement in analgesia caused by manual techniques such as joint mobilization has already been experimentally demonstrated^{22,23}. Here, we hypothesized that the technique of manual therapy aimed at the fascial system, performed at a distance from the site of injury, also produces an anti-hyperalgesic effect that can be mediated, at least in part, by the nervous system, specifically by the opioid and cannabinoid systems. To investigate this hypothesis, the present study evaluated the effect of different times of distance treatment with a manual therapy technique directed to the fascial system on mechanical hyperalgesia and edema; and analyzed the role of peripheral opioid and cannabinoid receptors in induced anti-hyperalgesia in male mice.

In this way, understanding the mechanism of action of analgesia produced by manual therapy techniques can further encourage the use in clinical practice of this low-cost, non-pharmacological solution for pain treatment, which is a promising field. The novelty of this study is characterized by using a manual intervention focused on the fascial system, the myofascial reorganization²⁴⁻²⁷, through a technique directed to TLF adapted for mice, the manipulation of the fascial system (MFS)²⁴ and apply it in the treatment of these animals with paw inflammation. Advocating specific pressure loads (45°, traction and shear) and distance treatment, based on mechanobiology, mechanotransduction and biotensegrity²⁴⁻³⁰. These, primordial factors of the interventions directed to the fascial system.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

All animal care and experimental procedures were carried out in accordance with the National Institutes of Health Animal Care Guidelines (NIH publications No. 80-23) and were approved by the Ethics Commission for the Use of Animals of University of Southern Santa Catarina (CEUA-Unisul) (protocol number 19.049.2.07.IV). The present study employed male Swiss mice (25-35 g) obtained from the Federal University of Santa Catarina (UFSC). Animals were housed under a 12 h light/12 h dark cycle (lights on at 6:00 a.m.) in a room with controlled temperature (22±2°C) and given food and water ad libitum. Animals were habituated to the laboratory conditions for at least 1 h before testing. Experiments were performed between 6:00 a.m. and 16:00 p.m.

Sample size

The number of animals used was the minimum necessary to demonstrate the effects obtained by the treatment (n/total=392), requiring the number of 8 animals per group, based on Daniel (2008)³¹. The calculation presents the following equation to obtain a confidence coefficient of 95%: $n=\{[(z \ alpha + z \ beta) * s]/sigma\}^2$. The total number of animals per experiment were: Verification of different treatment times (n=40); Involvement of peripheral nervous system (n=32); Involvement of peripheral and central opioid receptors (n=96); Involvement of peripheral and central cannabinoid receptors (n=96); Quantification of the immunocontent of opioid and cannabinoid receptor (n=64); Quantification of pro- and anti-inflammatory cytokines (n=32); and Histological analysis (n=32).

Drugs

The following substances were used: CFA (Sigma Chemical Co.,St Luis, MO, EUA); Saline (LBS Laborasa Industry Pharmaceutical, SP, Brasil); Ketamine (150 mg/Kg); Xylazine (30 mg/Kg); Isoflurane (1-2% / Biochimico, Itatiaia, RJ, Brasil); Naloxone (Tocris Cookson Inc., EUA / *mu*-opioid receptor); AM630 (Cayman Ann Arbor, Michigan, EUA / CB₂-R antagonist); Lidocaine (XY Lestesin, Lidocaine Hydrochloride – Cristália Chemical Pharmaceuticals LTDA, SP, Brasil); Primary antibodies, diluted in TBS-T containing 1% BSA, against the proteins: CB₂-R (1:1000), μ -opioid receptor (1:1000) and beta-actin (1:45000); ELISA Kits for mice: IL-1 β (catalog number DY401-05, R&D Systems[®], Minneapolis, MN, USA), IL-6 (catalog number DY406-05, R&D Systems[®], Minneapolis, MN, USA), IL-10 (catalog number DY417, R&D Systems[®], Minneapolis, MN, USA); Alcohol Santa Cruz; Xilol solven; Paraffin solven; Hematoxilina Newprov; Eosina Allkimia.

volume 20µl, was injected. When drugs were administered by intrathecal (i.t.) route volume of 5µl, was injected. Appropriate control treated groups also were assessed simultaneously. The doses of all substances used were chosen based on data in the literature or were selected from preliminary experiments conducted in our laboratory²²⁻²⁴.

Induction of persistent inflammatory hyperalgesia

The induction of the animal model of persistent inflammatory hyperalgesia was performed by an i.pl. injection of 20 μ l of CFA 50% (0.5 mg/ml) into the ventral surface of the right hind paw^{9,32} (Fig. 1).



Figure 1: Schematic representation of the experimental design. MFS: Manipulation of the Fascial System; CFA: Freund's Complete Adjuvant; vF: von Frey; D: Day.

Manipulation of the fascial system treatment

Manipulation of the fascial system (MFS) treatment was performed using the myofascial reorganization (MR) technique (Fig. 2). MR is based in sustained pressure and shear loads (tangential 45°), based on circuit mechanobiology, mechanotransduction, biotensegrity and clinical practice²⁴⁻³⁰. We carry out an adaptation of the protocol previously described by França and cols. (2020)²⁴ which performed a translation of the treatment performed in humans to mice. The protocol was based on previous studies on anatomy and dissection of the fascial complex in mice performed in our lab (data not published), with the objective of preserving the principles of the technique applied to humans, seeking to find the most adequate correspondence between the characteristics of human treatment when applied to mice. During the procedure, the animal was anesthetized with 2% isoflurane to 100% oxygen. The MFS protocol was applied as follows:

Moment 1: Preparatory moment, load in compression and shear. Duration of 1 min and 30 s, animal in prone position. The physical therapist will anchor the

lower insertion of the lower back fascial complex (near the tail) with a finger; with another finger, the therapist performs compression sustained at 45°, with subsequent shear loading, in the superior insertion, in the cranial direction, promoting a gentle stretching of the fascial tissue, but not muscle.

Moment 2: Direct technique, load in tension and shear. Duration of 5 min, animal in prone position, the physical therapist anchors the lower insertion area of the thoracolumbar fascial tissue with two fingers at the level of the animal's iliac (right and left sides) keeping this fixed and sustained point; and with two other fingers on the superior insertion, the therapist applied a traction load and subsequent continuous shear in the craniocaudal direction of the animal.

Moment 3: Diagonal technique, load in compression and shear. Duration of one 1 min and 45 s for each diagonal. The animal was carefully positioned in the supine position in the hands of the physical therapist (in a crib). Then, the therapist's index fingers were on one side, and the ring fingers on the other side of the animal's lumbar spine, in order to contemplate the entire fascial complex of the thoracolumbar region. The therapist performed a diagonal pressure point, with compressive loading and subsequent shearing, first with an index and ring finger and, later, changing the pressure to the other fingers (index and ring), thus forming an X in the thoracolumbar region of the animal. Each diagonal was held at separate moments.

Control treatment: After manual contact of the physical therapists with the mouse's thoracolumbar fascia, mechanical traction and shear loads were not performed. This manual contact was maintained for the same time.



Figure 2: Schematic representation of the proposed protocol. Divided into 3 moments: (A) moment 1, (B) moment 2 and (C) moment 3.

Measurement of mechanical hyperalgesia

The mechanical hyperalgesia was measured as described previously³². This test was carried out with the mice confined in glass cylinders (20 cm diameter) and an elevated wire mesh platform to allow access to the ventral surface of the hind paws. The right hind paw was stimulated with a constant pressure of 0.6 g vonFrey filaments (Stoelting, Chicago, USA). The response frequency to 10 applications was taken as the nociceptive behavior. The response to mechanical stimulation (the number of paw withdrawals) was recorded and expressed as a percentage of the withdrawal response³².

To assess the effects of MFS on CFA-induced inflammatory pain, animals were treated with MFS at 24 h and 96 h after CFA i.pl. injection (Fig. 1). Development of mechanical hyperalgesia was evaluated at 0.5 h after treatment to verify the time course of MFS in reducing mechanical hiperalgesia⁵. In this experiment, the following groups (n = 8) were used: (1) CFA + Control, (2) CFA + MFS 5 min, (3) CFA + MFS 10 min, (4) CFA + MFS 20 min.

Assessment of involvement of peripheral nervous system on analgesia caused by MFS

To determine the involvement of peripheral nervous system on the antihyperalgesia induced by MFS 10 min, the animals received an injection of lidocaine i.f. (200 μ g / 20 μ l/i.f.) or saline i.f. (20 μ l/i.f.). In the 24 h and 96 h after CFA. In this experiment, the following groups (n = 8) were used by different routes: (1) CFA + Saline + Control, (2) CFA + Lidocaine + Control, (3) CFA + Saline + MFS 10 min, (4) CFA + Lidocaine + MFS 10 min.

Assessment of paw edema

Edema assessment was performed by measuring the thickness of the right hind paw with a digital micrometer (Insize[®], SP, Brazil). The results were expressed as the difference between the thickness of the right hind paw (submitted to CFA) and the baseline value (before the CFA procedure) of the same paw (Fig. 1). To assess the effects of MFS on CFA-induced inflammatory edema, animals were treated with MFS at 24 h and 96 h after CFA i.pl. injection (Figure 1). Baseline edema and 0 h, 1 h and 24 h - 30 min after treatment. In this experiment, the following groups (n = 8) were used: (1) Saline + Control, (2) Saline + MFS 10 min, (3) CFA + Control, (4) CFA + MFS 10 min.

Assessment of role opioid and cannabinoid receptors on peripheral and spinal pain modulatory sites on antihyperalgesic action caused by MFS *Opioid receptor*

To determine the involvement of peripheral and spinal *mu*-opioid receptor on the anti-hyperalgesia induced by MFS 10 min, in the 24 h and 96 h after CFA injection mice received an injection of naloxone i.f. $(5\mu g/20\mu l/i.f.)$, i.pl. $(5\mu g/20\mu l/i.pl.)$, i.t. $(5\mu g/5\mu l/i.t.)$ or saline i.f. $(20\mu l/i.f.)$, i.pl. $(20\mu l/i.pl.)$, i.t. $(5\mu g/5\mu l/i.t.)$. After 15 min, the animals received MFS 10 min. Mechanical hyperalgesia was evaluated 30 min after treatments. In this experiment, the following groups (n = 8) were used by

Cannabinoid receptor

Peripheral and spinal CB₂-R on the anti-hyperalgesia induced by MFS 10 min. In the 24 h and 96 h after CFA injection, the animals received an injection of AM630 i.f. $(4\mu g/20\mu I/i.f.)$, i.pl. $(4\mu g/20\mu I/i.pl.)$, i.t. $(2\mu g/5\mu I/i.t.)$ or saline i.f. $(20\mu I/i.f.)$, I.pl. $(20\mu I/i.pl.)$, i.t. $(5\mu I/i.t.)$. After 15 min, the animals received MFS 10min. Mechanical hyperalgesia was evaluated 30 min after treatments. In this experiment, the following groups (n = 8) were used by different routes: (1) CFA + Saline + Control, (2) CFA + AM630 + Control, (3) CFA + Saline + MFS 10 min, (4) CFA + AM630 + MFS 10 min.

Western Blotting Analysis

Samples were homogenized and incubated in RIPA lysis buffer [1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and PBS] plus 100 mM sodium orthovanadate, 100 mM PMSF, and a cocktail of 1% protease inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States). Then, the samples were incubated on ice for 30 min. After centrifugation at 6,000 × g for 20 min (at 4°C), the supernatant was collected, separated, and stored in a -80 °C freezer. Protein content was measured using the Bradford method, using a standard calibration curve with BSA (0.05–0.5 mg/ml). Total protein aliquots (50 μ g) were boiled at 95 °C for 5 min in 25% volume in Laemmli buffer (1M sodium phosphate pH 7.0, 10% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 50% glycerol, 0.1% bromophenol blue, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States).

The samples were submitted to electrophoresis on 10% polyacrylamide gel. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane for 2 h at 90 V constant voltage. The membrane was incubated for 1 h in blocking solution (5% milk powder, Molico[®]) and then washed and incubated with Ponceau S solution (Ponceau S solution, P7170, Sigma-Aldrich, MO, United States) for the determination of the transferred proteins. The membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies after Ponceau S washing and stain removal: anti-CB1-R (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), anti-CB₂-R (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), anti-Mu (1:1000, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) or anti-β-actin HRP (1:45,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After washing in Tris Buffer Saline with Tween[®] 20 (TBS-T) (137 mM NaCl and 20 mM Tris HCl + 0.1% Tween[®] 20, pH 7.6) the membranes were incubated with the specific secondary antibody was conjugated to peroxidase at room temperature for 1 h (Abcam, Cambridge, MA, United States). After this period, a new 30 min wash with TBS-T was performed, followed by exposure of the membranes for 1 min to the Chemiluminescence kit (ECL, Bio-Rad Laboratories, CA, United States) and detection using an imaging system (iBright Imaging Systems, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Bands were quantified by optical density using the software Image Studio Lite (LI-COR Biosciences, USA), expressed as the ratio to β -actin and expressed as arbitrary units.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays were carried out on samples homogenized in phosphate-buffered saline (PBS), containing: Tween[®] 20 (0.05%), PMSF (0.1 mM), EDTA (10 mM), aprotinin (2 ng/ml), and chloride benzethonium (0.1 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States). The samples were then centrifuged at 6,000 × g for 15 min (4°C), and the supernatant

was collected and stored at -80 °C for future analysis. The total protein content of the supernatant was measured by the Bradford method using a standard calibration curve with BSA (0.05–0.5 mg/ml)²². Aliquots with 100 µl were used to measure cytokine concentrations (IL-1 β , IL-6, IL-10) using ELISA kits for mice (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations were measured by interpolating an 8-point standard curve with colorimetric assays at 450 nm (corrected by subtracting readings at 550 nm) on a plate spectrophotometer (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co., Nanjing, China). The values were expressed as pg (cytokine) per mg (protein), as briefly described³³.

Histological evaluation:

For the morphometrical analysis, the fascial and muscular tissues were collected and fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections of 5.0 µm were used for histological hematoxylin and eosin (HE) slides. The histologic findings were semiquantitatively evaluated by six parameters (Table I): cellularity, proportion of cells resembling fibroblasts, proportion of cells oriented parallel, proportion of large and well formed collagen fibers, proportion of parallel fibers and the fascia thickness. For morphometrical analysis, photomicrographs were taken in an image capture system consisting of a trinocular microcope (Opticam O400s microscope, Opticam Microscopy Technology, Brazil) with the morphometrical software (OPTHD 3.7, Opticam Microscopy Technology, Brazil).

Table 1: Histological evaluation parameters semiquantitatively.

Item	Description
	 Low: rare cells are seen even on high power field (400x)

Cellularity	 Moderate: few cells are seen on high power field (400x) Marked: cells are easily seen on medium/high power field (100x/400x) Intense: cells are easily seen even on low power field (40x) 	
Cells resembling fibroblasts in HE	Proportion	
Cells parallel-oriented	1. 0-24%	
Large and well formed collagen fibers	2. 25-49% 3. 50-74%	
Fibers parallel-oriented	4. 75-100%	

Subtitle: HE, histological hematoxylin and eosin.

Statistical analyses

Data were analyzed with Graph Pad Prism software (v. 8.0 - La Jolla, California, USA). Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables. Normality of the data was conducted with the Shapiro-Wilk test. The data was analyzed using both two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. Differences with a value of p < .05 were considered significant.

RESULTS

MFS reduces mechanical hyperalgesia in a time dependent manner

The results presented in Figure 3 demonstrate that the injection i.pl. of CFA induced an increase in the frequency of paw withdrawal response (mechanical hyperalgesia) of mice when compared to baseline. In 24 h after i.pl. of CFA, acute treatment with MFS by thoracolumbar fascia for 10 min caused a significant reduction in mechanical hyperalgesia evaluated at 0.5 h (P = 0,004) after treatment. However, treatments with MFS 5 min or MFS 20 min showed no

decrease in mechanical hyperalgesia. In 96 h after i.pl. of CFA, the treatment with MFS for 10 min and 20 min caused a significant reduction in mechanical hyperalgesia evaluated at 0.5 h after treatment (P = 0.007 and P = 0.039, respectively). Effect not observed at 5 min of treatment. The present results show that 10 min was the best time observed.



Figure 3: Anti-hyperalgesic effect of MFS by thoracolumbar fascia on mechanical hyperalgesia induced by CFA paw injection. Time-course effect on 24 h and 96 h after CFA injection intraplantar. Each dot represents the average of 8 animals, and the vertical lines show the standard deviation. performed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. *P < 0.05 and **P < 0.01. when compared with control group. Abbreviations: MFS, Manipulation of the Fascial System; h, hours.

Assessment of involvement of peripheral nervous system on analgesia

caused by MFS

The figure 4 shows that treatment with MFS 10 min reduced the frequency of CFA-induced response (P = 0.001). Furthermore, pretreatment of animals with lidocaine (i.f.) 15 min before MFS 10 min, prevented the decrease in response frequency resulting from treatment at 24 h and 96 h (P = 0.002 and P = 0.001, respectively). However, treatment with saline and lidocaine was not able to

change the response frequency of the animals, observed at 24 h and 96 h.



Figure 4: Intrafascial pretreatment with lidocaine in the antihyperalgesic effect of MFS. White bars show the pretreatment of animals with intrafascial saline (20µl/i.f.). Striped bars show the pretreatment of animals with intrafascial lidocaine, both at 24 h and 96h. Each point represents the mean of 8 animals, and vertical lines show the standard deviation of the mean. ***P <0.001 when compared with CFA + saline + control groups or ## P <0.01 or ### P <0.001 when compared with CFA + saline + 10 min of MFS group. Abbreviations: i.f., intrafascial; MFS, Manipulation of the Fascial System.

Effects of treatment with MFS on edema of paw

Figure 5 shows that acute treatment at 24 h and 96 h with MFS 10 min was not

able (P > 0.05) to reduce paw edema. In white bars CFA + Control group and

striped bars CFA + MFS group.



Figure 5: Effect of MFS on paw edema. White bars expressed results as the difference between the thickness of the right hind paw and the baseline value of the same paw (panels A and B). Striped bars results expressed as the difference of thickness of the right hind paw before and after treatment (panels A and B). Bars represents the average of 8 animals, and the vertical lines show the standard deviation. performed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. P > 0.05 when compared with control group. Abbreviations: MFS, Manipulation of the Fascial System; h, hours.

Assessment of opioid and cannabinoid receptors

Evaluation of role peripheral and central opioid receptor on anti-hyperalgesic

action of MFS

To verify whether the anti-hyperalgesic effect of MFS can be mediated via the activation of opioid receptor we administrated selective opioid antagonist, naloxone in different sites. The figure 6 shows percentage of response frequency values for the group pretreated with MFS 10 min group was significantly lower (P < 0.001) when compared to animals pretreated with saline via i.f., i.pl. or i.t. routes, 0.5 h after MFS in both 24 h and 96 h (Fig. 6). However, the percentage of response frequency values for the groups pretreated with naloxone via i.f., i.pl. or i.t. routes were significantly higher when compared to MFS 10 min group, 0.5 h after MFS in both 24 h (P = 0.001, P = 0.001 and P = 0.031, respectively) and 96 h (P = 0.001, P = 0.001 and P = 0.049, respectively) (Fig. 6). The present

results provide evidence to role of central (spinal cord) and peripheral opioid receptor on anti-hyperalgesic action of MFS.



Figure 6: Effect opioid receptor. Intrafascial (A and B), intraplantar (C and D) and intrathecal (E and F) pretreatment with naloxone and the anti-hyperalgesic effect of MFS in mice. White bars show the CFA (control) + saline group (20µl/i.f., 20µl/i.pl. and 5µl/i.t.) or the anti-hyperalgesic effect of MFS in mice. Striped bars show the effects of naloxone (5µl/i.f., 5µl/i.pl. and 5µl/i.t.) antagonist injected before MFS treatment. Each point represents the mean of 8 animals, and vertical lines show the standard deviation of the mean. *P <0.05 or ***P <0.001 when compared with CFA + saline + control groups or ### when compared with CFA + saline + MFS groups. Abbreviations: i.f., intrafascial; i.t., intrathecal; i.pl., intraplantar; MFS, Manipulation of the Fascial System; CFA, Freund's Complete Adjuvant.
Evaluation of role peripheral and central cannabinoid receptor on antihyperalgesic action of MFS

To verify whether the anti-hyperalgesic effect of MFS can be mediated via the activation of cannabinoid receptor we administrated selective CB₂R antagonist, AM630 in different sites. The figure 7 shows percentage of response frequency values for the group pretreated with MFS 10 min group was significantly lower (P < 0.001) when compared to animals pretreated with saline via i.f., i.pl. or i.t. routes, 0.5 h after MFS in both 24 h and 96 h. However, the percentage of response frequency values for the groups pretreated with AM630 via i.f., i.pl. or i.t. routes were significantly higher when compared to MFS 10 min group, 0.5 h after MFS in both 24 h (P = 0.017, P = 0.014 and P = 0.006, respectively) and 96 h (P = 0.001, P = 0.001 and P = 0.049, respectively; Fig. 7).



Figure 7: Effect cannabinoid receptor. Intrafascial (A and B), intraplantar (C and D) and intrathecal (E and F) pretreatment with AM630 and the anti-hyperalgesic effect of MFS in mice. White bars show the CFA (control) + saline group (20µl/i.f., 20µl/i.pl. and 5µl/i.t.) or the anti-hyperalgesic effect of MFS in mice. Striped bars show the effects of AM630 (4µl/i.f., 4µl/i.pl. and 2µl/i.t.) antagonist injected before MFS treatment. Each point represents the mean of 8 animals, and vertical lines show the standard deviation of the mean. *P <0.05 or ***P <0.001 when compared with CFA + saline + control groups or ### when compared with CFA + saline + MFS groups. Abbreviations: i.f., intrafascial; i.t., intrathecal; i.pl.,

intraplantar; MFS, Manipulation of the Fascial System; CFA, Freund's Complete Adjuvant.

Assessment of opioid and cannabinoid receptors expression

Immunocontent intact of mu-opioid receptor

The figure 8 shows that in the paw, there was a decrease in the immunocontent of *mu*-opioid receptor after CFA injection when compared to the Saline + Control group (P= 0.001, Fig. 8-A). In addition, the MFS 10 min group had lower immunocontent in the thoracolumbar fascia when compared to the CFA + Control group (P= 0.05, Fig. 8-B). Treatments did not change the *mu*-opioid receptor immunocontent in the spinal cord 96 h after CFA injection (Fig. 8-C).



Figure 8: Immunocontent of *mu*-opioid receptor in the paw, thoracolumbar fascia and spinal cord of animals subjected to MFS at 96 h of daily treatment. Each point represents the mean of 8 animals, and vertical lines show the standard deviation of the mean. ***P = 0.001 when compared with CFA + saline + control group or \$ P < 0.05 when compared with CFA + saline + MFS group. Abbreviations: MFS: Manipulation of the Fascial System; CFA: Freund's Complete Adjuvant.

CB₂R Immunocontent

In the paw and thoracolumbar fascial, had higher immunocontent of CB₂R after CFA injection when compared to the Saline + Control group (P = 0.002 and P = 0.05, respectively; Figs. 9-G and 9H). Furthermore, the MFS 10 min group had lower immunocontent in the thoracolumbar fascia when compared to the CFA +



Figure 9: CB₂R Immunocontent in the paw, thoracolumbar fascia and spinal of animals subjected to MFS at 96 h of daily treatment. Each point represents the mean of 8 animals, and vertical lines show the standard deviation of the mean. **P = 0.002 when compared with CFA + saline + control group or \$ P < 0.05 when compared with CFA + saline + MFS group. Abbreviations: MFS, Manipulation of the Fascial System; CFA, Freund's Complete Adjuvant.

Determination of pro- and anti-inflammatory cytokines levels evaluation

The figure 10 shows that proposed model generated inflammation 96 h after application of CFA in the paw of mice. We observed that the CFA group had higher concentrations of IL-1 β and IL-6 in paw (panel A, P = 0.001 and panel D, P = 0.001) and reduced IL-10 in paw (panel G, P= 0.003). There was no change in these cytokines in the thoracolumbar fascia and spinal cord (panel B-F, P > 0.05). Interestingly, MFS decreased IL-10 in the Saline group in the thoracolumbar (panel H, P = 0.006). However, we found no changes in cytokine concentrations in the paw and spinal cord between treated groups (panel A-I, P > 0.05).



Figure 10: Effect of MFS by thoracolumbar fascia on inflammatory cytokine levels IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the paw, fascia thoracolumbar and spinal cord at 96 h of daily treatment. In paw: **P = 0.003 and ***P = 0.001 when compared with control group; In TLF: **P = 0.006 when compared MFS + Saline with Saline. Abbreviations: MFS, Manipulation of the Fascial System; CFA, Freund's Complete Adjuvant; IL, interleukin; TLF, Thoracolumbar fascia.

Semiquantitatively histological analysis

The figure 11 shows in the Saline group, collagen fibers with low cellularity are observed, with rare cells with fibroblast morphology (HE, 400x), observed in panel A. In the Saline + MFS group, there is moderate cellularity in the fascia, with some with enlarged nuclei (HE, 400x), observed in panel B. In the CFA group, cellularity is low to moderate, with cells with small nuclei and inconspicuous nucleoli, compatible with inactive fibroblasts (HE, 400x), observed in panel C. In the CFA + MFS group, there is low to moderate cellularity, with cells with an enlarged nucleus and evident nucleolus, compatible with activated fibroblasts (HE, 400x), observed in panel D.



Figure 11: The arrow shows the fibroblast in thoracolumbar fascia in panel A: CFA group; panel B: Saline group; panel C: Saline + MFS group; and panel CFA + MFS group. Abbreviations: MFS, Manipulation of the Fascial System; CFA, Freund's Complete Adjuvant.

DISCUSSION

In this study, it was demonstrated that the manipulation of the fascial system (MFS) through the manual technique of myofascial reorganization (MR) performed on the thoracolumbar fascia (TLF) was able to produce a significant anti-hyperalgesic effect when analyzed in the chemical model of induced hiperalgesia by intraplantar (i.pl.) injection of Complete Freund's Adjuvant (CFA). In addition, the role of opioid and cannabinoid receptors in this effect was shown for the first time in the literature. The most relevant results of this study were that, (1) MFS performed in TLF significantly and time-dependently reduced mechanical hyperalgesia in the early (24 h) and late (96 h) phase of mouse paw inflammation; (2) MFS performed in TLF did not significantly alter paw edema and inflammatory cytokine concentrations; (3) the reduction in anti-hyperalgesia caused by MFS performed in TLF was significantly prevented by pretreatment of animals with lidocaine, naloxone and AM630; (4) MFS performed in TLF significantly modulated the immunocontent of mu-opioid and CB₂R receptors in TLF; e (5) the MFS maintained the healthy fascial tissue during the technique, in addition to the fibroblast being more active.

In this study, the MFS is based on the MR. MR has been demonstrating its effects on humans. Applied on trapezius muscle increased the tissue saturation index, which reflects on peripheral muscle oxygenation²⁶; application for 10 min increases the tissue hemoglobin level²⁷; associated with kinesiotherapy can improve chronic pain and upper limb functionality in breast cancer survivors²⁵; and mice with increase in TGF-β1 and IL-4²⁴. However, the mechanisms of action had not been evaluated. This emphasizes the importance

in the present study. Understanding mechanisms of action and demonstrating effectiveness brings safety to the clinician, patient and provides a scientific basis.

There are different stimuli to induce the inflammatory process in the paw of mice, in the present study we used the model of peripheral inflammatory nociceptive pain evoked by CFA that acts as an irritating agent and is well established in the literature^{32,34,35}. The CFA is a suitable model as it mimics the cardinal signs of inflammation including histopathological changes, cellular infiltration, hypersensitivity to mechanical stimuli and edema at the affected site^{36,37}, due to alterations in the production of peripheral inflammatory mediators, facilitating prolonged depolarization of the neuronal membrane and exacerbating hyperalgesia³⁷. In addition, inflammation induced by i.pl. of CFA can be easily assessed by the behavioral von Frey filament (vF) test. The model used is inherent to the research group's routine, to assess mechanical hyperalgesia at different time frames 24 h and 96 h after application of the adjuvant^{32,38,39}. Periods the time were used to analyze nociceptive pain because there is a predominant migration of different cell types at each moment in time. In the initial phase (from 6 h to 24 h) of inflammation, there is a predominant presence of leukocytes of the neutrophil type, while in the late phase (96 h), macrophages are more prevalent^{40,41}. Additionally, various endogenous mediators responsible for pain control, such as opioids (met-enkephalin and β-endorphin) are produced and released by neutrophils and monocytes/macrophages^{40,42,43}. The expression of opioid peptides in these immune cells occurs initially in granulocytes, in the early stages of inflammation (2 h to 6 h), while the expression increases in monocytes and macrophages in late stages (96 h). Endogenous opioid modulation of pain parallels the recruitment of immune system cells⁴⁰. Thus, the evaluation of Initially, we verified that the MFS performed in the TLF was able to significantly reduce mechanical hyperalgesia in the inflamed paw and later we determined the best time of this anti-hyperalgesic effect. From this first experiment, we concluded that MFS was able to produce an effect at a distance. This conclusion derives from the fact that the treatment was performed at a distant site (TLF) from the lesion site (right paw). Due to the originality nature of the therapeutic approach of the present study, a direct comparison of our results with data from the literature is impossible. The studies found in the literature are of manual therapy techniques applied to the lesion site^{22,23,24,37}. Bordoni and Myers (2020)³⁰ remember that there are many theoretical representations regarding the connection between fascial structures, but that further advances are needed to better understand fascia and understand fascial behavior in the presence of local and systemic dysfunctions. Thus, we chose this treatment approach precisely because it is widely used in clinical practice, but still with little understanding.

In this sense, we sought answers in the nervous system to understand some of the mechanisms involved in the anti-hyperalgesic action of the MR technique through MFS. This anti-hyperalgesia observed at a distance may be related to the fact that both the treatment site and the lesion site share the same dermatomes⁴⁵⁻⁴⁷. In the lumbar region that received the treatment are the lumbar dermatomes that extend to the hind limb of the animals reaching the plantar region, which was inflamed⁴⁵⁻⁴⁷. This neuronal connection of the lumbar region

with the mouse plantar surface provides a plausible neurophysiological explanation that may support the observed effects.

We also determined that 10 min and 20 min were the treatment times effective in significantly reducing mechanical hyperalgesia, but only the 10 min time reduced mechanical hyperalgesia at 24 h and 96 h after CFA. Thus, we chose the time of 10 min to perform the following experiments.

We have previously demonstrated that MFS performed on inflamed TLF of mice induced by i.f. of carrageenan was able to significantly increase the concentrations of IL-4 and TGF- β , but did not change the concentrations of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), IL-6 and TNF. However, this previous study did not evaluate the effect of different²⁴. Studies with ankle joint mobilization, a TM technique that mobilizes the (plantar) fascia indirectly, of mice with paw inflammation caused by CFA, also found that 9 min (close to what we used) was the best treatment time to reduce significantly mechanical hyperalgesia^{22,23}.

Although the observed anti-hyperalgesic effect, MFS treatment did not reduce paw edema. In addition, another result of the present study was the assessment of the concentrations of inflammatory cytokines. It was observed that the inflammatory model used induced inflammation in the injected paw by increasing the concentrations of IL-1 β , IL-6 decreasing the concentrations of IL-1 β and that the treatment with MFS did not change the concentrations of these cytokines. CFA injection is known to cause persistent inflammatory pain^{32,38,39,48,49} increasing the local concentration of IL-1 β responsible for the production and maintenance of hyperalgesia⁵⁰. The local production of products related to the action of cyclo-oxygenase, such as prostaglandins, induced by the

action of IL-1^β in neighboring nociceptors contribute to paw hyperalgesia. Inhibition of cyclo-oxygenase is able to attenuate this paw hyperalgesia caused by IL-1 β^{50} . Thus, the increase in IL-1 β in the present study, after the application of CFA, could explain the local peripheral hyperalgesia (in the paw), since the application of the adjuvant did not cause an increase in this interleukin to the spinal cord. The same behavior was observed in IL-6. In vitro with skeletal muscle cells, IL-1 β induced the release of IL-6, suggesting a synergistic effect of IL-1 β and IL-6⁵¹. Even so, IL-1 β is a potent hyperalgesic agent⁵², but not in IL-6, although both are cyclo-oxygenase mediated, which terminate with the activation of prostanoids⁵³. Regarding IL-10, it has been observed that i.pl. injection of CFA causes a significant increase in the gene expression of TNF, IL-1 β and IL-10 in the first 6 h and that IL-10 shows a decline up to 16 h, these inflammatory factors remain elevated even 24 h after paw inflammation in mice. However, the authors did not analyze the delayed inflammatory response induced by CFA, i.e., after 24 h. Even so, the behavior of IL-10 in our model corroborates that observed by Chen and cols. (2010)⁵².

It was observed that MFS did not alter the inflammatory process when applied at a distance from the inflammation site, as no significant changes were observed in anti- and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL6 and IL-10) and edema. However, originality of the present study does not allow comparisons with other authors besides those mentioned above, which opens the possibility of new studies related to persistent inflammation and the application of interventions directed to the fascial system, such as MFS. Additionally, the treatment with MFS performed at a distance did not cause the same effect (increase in IL-4 and TGF- β concentrations) as that observed with application directly on the inflammation

seen by França and cols. $(2020)^{24}$. In contrast, Omura and cols. $(2022)^{44}$ did not observe a decrease in IL-1 β and TNF (pro-inflammatory cytokines) in the inflamed paw (CFA) of mice treated with joint mobilization for 9 min, but corroborating our findings, they also noted a reduction in mechanical hyperalgesia. In this sense, we can suggest that treatment with MFS has an antihyperalgesic effect, but not an anti-inflammatory effect, at least under the conditions analyzed in the present study.

It is known that the application of MFS does not change the expression of immune cells²⁴, although the findings of the present study favor the use of the technique in the modulation of inflammatory pain. Thus, we believe that there is an action of non-migratory resident cells in this modulation. Corroborating this information, our results from the semi-qualitative histological analysis show that the fibroblast was inactive in TLF after application of CFA to the paw, but active after MFS in CFA inflammation. It was also observed that the CFA, when applied to the paw, deactivates the fibroblast present in the TLF and when applying the MFS, this cell is activated. It should be noted that cytokines such as IL-1 β and IL-10, respectively pro and anti-inflammatory, can be released by migrating cells or local tissue cells.

Regarding the mechanism of action, the present study verified the participation of the peripheral nervous system (PNS) in the effect of MFS, it was observed that lidocaine (a potent PNS anesthetic) administered in TLF, at a dose that had no effect per se, was able to significantly prevent the anti-hyperalgesic effect of MFS, thus suggesting that the participation of the PNS in the anti-hyperalgesic effect. MFS hyperalgesic in the two time windows evaluated, 24 h and 96 h. The PNS has the function of connecting all parts of the organism to the

central nervous system, in ascending and descending stimuli. TLF innervation has been described in humans and animals^{26,54,55}. However, to date, there is no description of the involvement of the PNS in the effects caused by manual interventions aimed at the fascial system. Due to the difficulty of discussing our findings, acupuncture-related studies were used that showed the participation of the PNS and analyzed the involvement of connective tissue. Some actions of the needle on connective tissue and the mechanism of action were described. They found that the PNS and connective tissue can mediate the effects of manual acupuncture through several pathways: transmission of a mechanical signal from the needle to nearby sensory afferent nerves, potential purinergic signaling within connective tissue fibroblasts with local effects on sensory nerves, and direct effects on connective tissue pathology, possibly involving reductions in inflammation and/or fibrosis^{56,57}. In contrast, one study contested the involvement of connective tissue in mediating the effects of acupuncture⁵⁸. Using a robotic device that mimicked acupuncture needle twisting, reduced cocaine-induced locomotor activity, immobilization-induced hypertension, and mustard oil-induced visceral pain was demonstrated, which was completely prevented by blocking afferent neurons with bupivacaine, but not by connective tissue degradation with collagenase type I. The authors suggested that the PNS is involved, but the modulation of connective tissue does not appear to be sufficiently reliable to serve as the main explanation for the effects of acupuncture, at least in the animal models tested⁵⁸.

Furthermore, it was observed that the anti-hyperagesic action of MFS was prevented by the administration of naloxone or AM630 by i.f. (intrafascial), i.pl. (Intraplantar) and i.t. (Intrathecal) at 24 h and 96 h after CFA. Complementary to the pharmacological findings, the immunocontent of these receptors was analyzed in samples collected from the paw, TLF and spinal cord after daily treatment with MFS for 4 days after CFA. In mice, referring to the mu-opioid receptor, in the spinal cord there is the presence of *mu*-opioid receptors, corroborating the literature⁵⁹, but there was no change in this immunocontent after CFA injection and with MFS treatment. Peripherally, the presence of this receptor was observed in the paw, confirming previous findings⁶⁰, and its decrease with the application of CFA, without change after MFS. In the TLF, the expression of this receptor and its modulation were observed in an originally way after treatment with MFS. Regarding the CB₂R receptor, its presence was observed in the paw, but unlike the *mu*-opioid receptor, its elevation was noted after injection with CFA. In the spinal cord, its presence was observed, but without change after CFA and MFS. In TLF, its presence, increased expression after CFA and modulation after MFS was observed, corroborating the literature on the presence of CB₂R in fascia and that the cannabinoid system within the fascia can be stimulated during treatments and manipulative exercises^{16,19}.

These findings suggest that central (spinal cord) and peripheral (located in the paw and TLF) opioid and cannabinoid receptors participate in the neurobiological mechanism involved in the anti-hyperalgesic effect of MFS in mice. Health professionals often use interventions that target the fascial system to treat pain and musculoskeletal dysfunction⁶¹, however, their mechanisms of action are still unknown in the literature, non-clinical and clinical studies with interventions directed directly to the fascial system and the participation of opioid and cannabinoid systems were not found. Opioid receptor expression is centrally described in the thalamus, cerebral cortex, amygdala, nucleus accumbens, brain

stem, substantia nigra, reticular formation, periaqueductal gray, and spinal cord⁶², and peripherally, it is present in primary afferent neurons, ganglia, and enteric nerves^{63,64}. In addition to vital organs⁶⁵ and connective tissue^{66,67}. In addition to spinal and supraspinal sites that produce opioid analgesia, opioid receptors expressed in peripheral neurons may also contribute to peripheral opioid antinociception. Endogenous opioid peptides bind to opioid receptors, which are synthesized in the sensory ganglion of the spinal nerve and transported along intraaxonal microtubules to the peripheral (and central) terminals of sensory neurons. The subsequent inhibition of ion channels that produce neuronal excitation (for example, TRPV1, Ca²⁺) and the release of substance P (sP) results in antinociceptive effects⁶⁸. Continued activation of nociceptors, by inflammation for example, leads to the co-release of glutamate and sP at presynaptic terminals in the posterior horn of the spinal cord.

In addition, the expression of *mu*, Delta and Kappa opioid receptors was confirmed in the sensory ganglion of the spinal nerve, spinal cord and trigeminal nucleus of the ascending pain pathway, as well as in the periaqueductal gray nuclei, predominantly mu and k in raphe nuclei⁶⁹. In the present study, the involvement of opioid receptors in the anti-hyperalgesic effect of MFS was investigated due to the presence of this receptor in connective tissue^{70,71}. Furthermore, it has been shown that the injection of 10 mg of naloxone antagonizes the analyzed variables of improvement provided with the local anesthetic bupivacaine in individuals with myofascial trigger point pain. Suggesting that therapeutic effects are mediated, at least in part, by activation of an endogenous opioid system⁷² and because the participation of this endogenous pain control mechanism in another manual therapy technique, joint mobilization,

122

has already been described²². Thus, in addition to the spinal and supraspinal sites that produce opioid analgesia, the expression of the opioid receptor in peripheral neurons may also contribute to the peripheral antinociception of opioids. In the present study, the involvement of the opioid receptor in the anti-hyperalgesic effect of MFS by means of pretreatment with naloxone administered at different sites (i.f., i.pl. or i.t.), which preferentially binds to the mu opioid receptor, prevented the action of the MFS. Considering the present data, it can be speculated that the anti-hyperalgesic action of MFS is probably related to the endogenous release of some substance that interacts with the opioid receptor. Based on these data, we suggest the participation, at least in part, of the opioid receptor in the anti-hyperagetic effect of MFS. However, this hypothesis deserves further studies.

The present study also demonstrates that CB₂R is involved in the antihyperalgesic action of MFS, as AM630, a selective CB₂R antagonist, completely prevented this effect. So far, two specific cannabinoid receptors have been characterized from mammalian tissues and exert their biological effects through two major coupled G-protein cannabinoid receptors, the CB₁R and CB₂R^{73,74}. These endogenous receptors and ligands [N-araquidonoil etanolamina (anandamida – AEA) and 2-araquidonoil-glicerol (2-AG)] are distributed by pain control pathways⁷⁵. Both the central and many of the peripheral effects of cannabinoids depend on receptor activation CB₁R. Expression of this receptor is abundant in the brain, particularly in discrete areas that are involved in the control of motor activity (basal ganglia and cerebellum), memory and cognition (cortex and hippocampus), emotion (amygdala), sensory perception (thalamus), and autonomic and endocrine functions (hypothalamus, pons, and spinal cord), but

the CB₁R receptor is also expressed on peripheral nerve terminals and various extraneural sites, such as testis, eye, vascular endothelium and spleen. In contrast, CB₂R is almost exclusively expressed in the immune system, both by cells, including B and T lymphocytes and macrophages, and by tissues, including spleen, tonsils, and lymph nodes^{76,77,78}, associated with the immune system and reduced inflammation⁷⁹.

These receptors are described in addition to non-neural tissues such as the fascial system (CB₁R and CB₂R), the presence of cannabinoid receptors on fascial fibroblasts suggests their possible role in pain modulation¹⁶. In addition, a study with the joint mobilization technique observed the involvement of these receptors in the anti-hyperalgesic effect of joint mobilization²³. It was demonstrated in the present study that the CB₂R cannabinoid receptor centrally and peripherally is involved in the antihyperalgesic effect of MFS by blocking the effect of MFS by AM630 on proposed pathways (i.f, i.pl. and i.t.). These sites are essential for pain control. Endogenous mechanisms that counterbalance the inflammatory changes triggered by the initial injury are activated promoting modulation. In this way, determining the mechanisms directly involved in this process, as well as the neurobiological pathways, provides more effectiveness of the techniques used, since it is well known that the activation of both receptor systems invokes intracellular signaling cascades that inhibit adenylyl cyclase⁸⁰, decrease the conductance of the Ca^{2+81,82}, and activated internally rectifier and A-type potassium channels⁸³. Activation of opioid and/or cannabinoid receptors produces antinociceptive results⁸⁴. In addition, another key factor is that with activation in peripheral sensory neurons, there are analgesic effects without inducing centrally mediated side effects as with the use of medications⁶⁰.

124

In conclusion, it was observed that treatment with MFS at a distance from the lesion site reduced mechanical hyperalgesia, the time of 10 min was the best at the two time points analyzed and that this reduction was prevented by pretreatment with naloxone and AM630 by all routes administered (i.f., i.pl. and i.t.). In addition, it caused modulation of *mu*-opioid and CB₂R receptors and activated fibroblasts, both in the FTL. However, it did not change the edema and inflammatory cytokines. These findings are important for future randomized controlled trials. These data contribute to the understanding of the neurobiological mechanisms involved in the therapeutic effect of MR as well as provides additional support for its use in the treatment of painful inflammatory conditions.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All experimental procedures were performed under a protocol approved (19.049.2.07.IV) by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Southern Santa Catarina.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

FUNDING

This study was supported by grants from the Foundation for Foundation to Support Research and Innovation in the State of Santa Catarina (FAPESC) grants n° 2020TR732 and grant no. 001. Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); Dr. Daniel Fernandes Martins is supported by research fellowships from CNPq (310128/2020-0) and Anima Institute (AI).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Research and Innovation Support Foundation of Santa Catarina State (FAPESC) and Fascia Research Socity for all support and financial support for the completion of this research.

REFERENCE

- 1. Tracey Jr, W. D. (2017). Nociception. Current Biology, 27(4), R129-R133.
- 2. Willman, A., Petzäll, K., Östberg, A. L., & Hall-Lord, M. L. (2013). The psycho-social dimension of pain and health-related quality of life in the oldest old. *Scandinavian journal of caring sciences*, 27(3), 534-540.
- Perrot, S., Cohen, M., Barke, A., Korwisi, B., Rief, W., & Treede, R. D. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic secondary musculoskeletal pain. Pain, 160(1), 77-82.
- Siddall, B., Ram, A., Jones, M. D., Booth, J., Perriman, D., & Summers, S. J. (2022). Short-term impact of combining pain neuroscience education with exercise for chronic musculoskeletal pain: a systematic review and metaanalysis. Pain, 163(1), e20-e30.
- Macintyre, P. E., Quinlan, J., Levy, N., & Lobo, D. N. (2021). Current issues in the use of opioids for the management of postoperative pain: a review. JAMA surgery.
- Coloma-Carmona, A., Carballo, J. L., Rodríguez-Marín, J., & Pérez-Carbonell, A. (2017). Use and dependence on opioid drugs in the Spanish population with chronic pain: Prevalence and differences according to sex. Revista Clínica Española (English Edition), 217(6), 315-319.
- Quentin, C., Bagheri, R., Ugbolue, U. C., Coudeyre, E., Pelissier, C., Descatha, A., ... & Dutheil, F. (2021). Effect of home exercise training in patients with nonspecific low-Back pain: a systematic review and Metaanalysis. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(16), 8430.
- Corp, N., Mansell, G., Stynes, S., Wynne-Jones, G., Morsø, L., Hill, J. C., & van der Windt, D. A. (2021). Evidence-based treatment recommendations for neck and low back pain across Europe: a systematic review of guidelines. European Journal of Pain, 25(2), 275-295.
- de Oliveira BH, Horewicz VV, da Silva RH, Salm DC, Salgado ASI, Cidral-Filho FJ, Bobinski F, Piovezan AP, Martins DF: ET-B receptors involvement in peripheral opioid analgesia induced by light-emitting diode photobiomodulation in male and female mice. J Photochem Photobiol B Biol 214:, 2021.

- 10. Donatello, N. N., Emer, A. A., Salm, D. C., Ludtke, D. D., Bordignon, S. A. S. R., Ferreira, J. K., ... & Martins, D. F. (2020). Lavandula angustifolia essential oil inhalation reduces mechanical hyperalgesia in a model of inflammatory and neuropathic pain: The involvement of opioid and cannabinoid receptors. Journal of Neuroimmunology, 340, 577145.
- 11.Langevin, H. M. (2021). Fascia mobility, proprioception, and myofascial pain. Life, 11(7), 668.
- 12. Sinhorim, L., Amorim, M. D. S., Ortiz, M. E., Bittencourt, E. B., Bianco, G., da Silva, F. C., ... & Martins, D. F. (2021). Potential Nociceptive Role of the Thoracolumbar Fascia: A Scope Review involving in vivo and ex vivo Studies. Journal of clinical medicine, 10(19), 4342.
- Salgado, A. S., Stramosk, J., Ludtke, D. D., Kuci, A. C., Salm, D. C., Ceci, L. A., ... & Martins, D. F. (2019). Manual therapy reduces pain behavior and oxidative stress in a murine model of complex regional pain syndrome type I. Brain sciences, 9(8), 197.
- 14. Kondrup, F., Gaudreault, N., & Venne, G. (2022). The deep fascia and its role in chronic pain and pathological conditions: A review. Clinical Anatomy.
- 15. National Center for Complementary and Integrative Health (NCCIH) [Internet]. Maryland: Three New Research Networks Will Focus on the Neural Mechanisms of Force-Based Manipulations. [cited 2022 April 29]. Available from: <u>https://www.nccih.nih.gov/about/offices/od/director/pastmessages/three-new-research-networks-will-focus-on-the-neuralmechanisms-of-force-based-manipulations</u>
- 16. Fede, C., Albertin, G., Petrelli, L., Sfriso, M. M., Biz, C., De Caro, R., & Stecco, C. (2016). Expression of the endocannabinoid receptors in human fascial tissue. European journal of histochemistry: EJH, 60(2).
- 17. Ji, R. R., Chamessian, A., & Zhang, Y. Q. (2016). Pain regulation by nonneuronal cells and inflammation. Science, 354(6312), 572-577.
- Langevin, H. M., Bouffard, N. A., Badger, G. J., latridis, J. C., & Howe, A. K. (2005). Dynamic fibroblast cytoskeletal response to subcutaneous tissue stretch ex vivo and in vivo. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 288(3), C747-C756.

- McPartland, J. M. (2008). Expression of the endocannabinoid system in fibroblasts and myofascial tissues. Journal of Bodywork and Movement Therapies, 12(2), 169-182.
- 20. Sinhorim, L., Amorim, M. D. S., Ortiz, M. E., Bittencourt, E. B., Bianco, G., da Silva, F. C., ... & Martins, D. F. (2021). Potential Nociceptive Role of the Thoracolumbar Fascia: A Scope Review involving in vivo and ex vivo Studies. Journal of clinical medicine, 10(19), 4342.
- 21. Wang, Ning, Jessica D. Tytell, and Donald E. Ingber. "Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus." Nature reviews Molecular cell biology 10.1 (2009): 75-82.
- 22. Martins, D. F., Bobinski, F., Mazzardo-Martins, L., Cidral-Filho, F. J., Nascimento, F. P., Gadotti, V. M., & Santos, A. R. (2012). Ankle joint mobilization decreases hypersensitivity by activation of peripheral opioid receptors in a mouse model of postoperative pain. Pain Medicine, 13(8), 1049-1058.
- 23. Martins, D. F., Mazzardo-Martins, L., Cidral-Filho, F. J., Gadotti, V. M., & Santos, A. R. S. (2013). Peripheral and spinal activation of cannabinoid receptors by joint mobilization alleviates postoperative pain in mice. Neuroscience, 255, 110-121.
- 24. França, M. E. D., Sinhorim, L., Martins, D. F., Schleip, R., Machado-Pereira, N. A., De Souza, G. M., ... & Santos, G. M. (2020). Manipulation of the fascial system Applied during acute inflammation of the connective tissue of the thoracolumbar region affects transforming growth factor-β1 and interleukin-4 levels: experimental study in mice. Frontiers in Physiology, 1517.
- 25. Cunha, N. D. S., Sinhorim, L., Schleip, R., Zomkowski, K., Santos, G. M., & Sperandio, F. F. (2022). Effects of myofascial reorganization associated with kinesiotherapy on chronic pain and functionality of breast cancer survivors: development of a study protocol. Fisioterapia em Movimento, 35(SPE).
- 26. Sinhorim, L., Amorim, M., Torres, L. J., Wagner, J., Niza, N. T., Lemos, F. D. P., ... & Santos, G. M. (2019). Acute effect of myofascial reorganization of the trapezius muscle in peripheral muscle oxygenation in asympomatic subjects–a case series. Manual Therapy, Posturology & Rehabilitation Journal, 1-7.

- 27. dos Santos Amorim, Mayane, et al. "Acute effects of myofascial reorganization on trapezius muscle oxygenation in individuals with nonspecific neck pain." Journal of Bodywork and Movement Therapies 29 (2022): 286-290.
- 28. Schleip, R. (2003). Fascial plasticity–a new neurobiological explanation: Part1. Journal of Bodywork and movement therapies, 7(1), 11-19.
- Steffen, Danielle, and Keith Baar. "Effects of Loading and Nutrition on Fascia." Fascia, Function, and Medical Applications. CRC Press, 2020. 115-127.
- 30. Bordoni, B., & Myers, T. (2020). A review of the theoretical fascial models: biotensegrity, fascintegrity, and myofascial chains. Cureus, 12(2).
- 31. Daniel W. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. 90 ed. New York; 2008.
- 32. Martins, D. F., Turnes, B. L., Cidral-Filho, F. J., Bobinski, F., Rosas, R. F., Danielski, L. G., ... & Santos, A. R. S. (2016). Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. Neuroscience, 324, 485-495.
- 33. Belmonte, L. A. O., Martins, T. C., Salm, D. C., Emer, A. A., de Oliveira, B. H., Mathias, K., ... & Martins, D. F. (2018). Effects of different parameters of continuous training and high-intensity interval training in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I. The Journal of Pain, 19(12), 1445-1460.
- 34. Gomes, R. P., Bressan, E., Silva, T. M. D., Gevaerd, M. D. S., Tonussi, C. R., & Domenech, S. C. (2014). Effects of one minute and ten minutes of walking activity in rats with arthritis induced by complete Freund's adjuvant on pain and edema symptoms. Revista Brasileira de Reumatologia, 54, 83-89.
- 35. Meotti, F. C., Missau, F. C., Ferreira, J., Pizzolatti, M. G., Mizuzaki, C., Nogueira, C. W., & Santos, A. R. (2006). Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. biochemical pharmacology, 72(12), 1707-1713.
- 36. Barton, N. J., Stevens, D. A., Hughes, J. P., Rossi, A. G., Chessell, I. P., Reeve, A. J., & McQueen, D. S. (2007). Demonstration of a novel technique

to quantitatively assess inflammatory mediators and cells in rat knee joints. Journal of Inflammation, 4(1), 1-8.

- 37. Rodrigues, M., Barbosa, R. I., Neves, L. M., Kuriki, H. U., Gonçalves, E. C., Santos, A. R., ... & Marcolino, A. M. (2022). Therapeutic ultrasound ameliorates hyperalgesia and edema on CFA-induced persistent inflammatory response in mice. Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition).
- 38. Martins, D. F., Brito, R. N., Stramosk, J., Batisti, A. P., Madeira, F., Turnes, B. L., ... & Piovezan, A. P. (2015). Peripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. Journal of neuroscience research, 93(1), 157-166.
- 39. Vieira, C., Salm, D. C., Horewicz, V. V., Ludtke, D. D., Emer, A. A., Koerich, J. F., ... & Martins, D. F. (2021). Electroacupuncture decreases inflammatory pain through a pro-resolving mechanism involving the peripheral annexin A1-formyl peptide receptor 2/ALX-opioid receptor pathway. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 473(4), 683-695.
- 40. Rittner, Heike L., Alexander Brack, Halina Machelska, Shaaban A. Mousa, Monika Bauer, Michael Schäfer, and Christoph Stein. 2001. "Opioid Peptide–Expressing Leukocytes." Anesthesiology 95 (2): 500–508.
- 41. Brack A, Rittner HL, Machelska H, Beschmann K, Sitte N, Scheafer M, Stein C (2004) Mobilization of opioid-containing polymorphonuclear cells by hematopoietic growth factors and influence on inflammatory pain. Anesthesiology 100:149–157.
- 42. Rittner, H. L., Hackel, D., Voigt, P., Mousa, S., Stolz, A., Labuz, D., ... & Brack, A. (2009). Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils. PLoS Pathogens, 5(4), e1000362.
- Rittner, H. L., Labuz, D., Schaefer, M., Mousa, S. A., Schulz, S., Schäfer, M., ... & Brack, A. (2006). Pain control by CXCR2 ligands through Ca2+-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. The FASEB journal, 20(14), 2627-2629.
- 44. Omura, C. M., Lüdtke, D. D., Horewicz, V. V., Fernandes, P. F., Galassi, T. D. O., Salgado, A. S. I., ... & Bobinski, F. (2022). Decrease of IL-1β and TNF in the Spinal Cord Mediates Analgesia Produced by Ankle Joint Mobilization

in Complete Freund Adjuvant-Induced Inflammation Mice Model. Frontiers in Physiology, 2540.

- 45. Takahashi, Y., Nakajima, Y., & Sakamoto, T. (1994). Dermatome mapping in the rat hindlimb by electrical stimulation of the spinal nerves. Neuroscience letters, 168(1-2), 85-88.
- Takahashi, Y., Takahashi, K., & Moriya, H. (1995). Mapping of dermatomes of the lower extremities based on an animal model. Journal of neurosurgery, 82(6), 1030-1034.
- 47. Takahashi, Y., Chiba, T., Kurokawa, M., & Aoki, Y. (2003). Dermatomes and the central organization of dermatomes and body surface regions in the spinal cord dorsal horn in rats. Journal of Comparative Neurology, 462(1), 29-41.
- 48. Barton, N. J., Stevens, D. A., Hughes, J. P., Rossi, A. G., Chessell, I. P., Reeve, A. J., & McQueen, D. S. (2007). Demonstration of a novel technique to quantitatively assess inflammatory mediators and cells in rat knee joints. Journal of Inflammation, 4(1), 1-8.
- 49. Rodrigues, M., Barbosa, R. I., Neves, L. M., Kuriki, H. U., Gonçalves, E. C., Santos, A. R., ... & Marcolino, A. M. (2022). Therapeutic ultrasound ameliorates hyperalgesia and edema on CFA-induced persistent inflammatory response in mice. Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition).
- 50. Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B., Bristow, A. F., & Poole, S. (1988). Interleukin-1β as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. Nature, 334(6184), 698-700.
- 51.Luo G, Hershko DD, Robb BW, Wray CJ, Luo G, Hasselgren P-O: IL-1 stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-. Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol 284:R1249-R1254, 2003.
- 52. Chen, Yong, Michael K. Boettger, Andreas Reif, Angelika Schmitt, Nurcan Üçeyler, and Claudia Sommer. 2010. "Nitric Oxide Synthase Modulates CFA-Induced Thermal Hyperalgesia through Cytokine Regulation in Mice." Molecular Pain 6: 1–11.

- 53. Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH: Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? Pharmacol Ther 2006, 112: 116–138.
- 54. Fede, C., Petrelli, L., Pirri, C., Neuhuber, W., Tiengo, C., Biz, C., ... & Stecco, C. (2022). Innervation of human superficial fascia. Frontiers in Neuroanatomy, 16.
- 55. Suarez-Rodriguez, V., Fede, C., Pirri, C., Petrelli, L., Loro-Ferrer, J. F., Rodriguez-Ruiz, D., ... & Stecco, C. (2022). Fascial Innervation: A Systematic Review of the Literature. International Journal of Molecular Sciences, 23(10), 5674.
- Langevin, H. M., Bouffard, N. A., Churchill, D. L., and Badger, G. J. (2007). Connective tissue fibroblast response to acupuncture: dose-dependent effect of bidirectional needle rotation. J. Altern. Complement. Med. 13, 355– 360.
- 57. Langevin, H. M., and Yandow, J. A. (2002). Relationship of acupuncture points and meridians to connective tissue planes. Anat. Rec. 269, 257–265. Wu, M.-L., Xu, D.-S., Bai, W.-Z., Cui, J.-J., Shu, H.-M., He, W., et al. (2015). Local cutaneous nerve terminal and mast cell responses to manual acupuncture in acupoint LI4 area of the rats. J. Chem. Neuroanat. 68, 14–21.
- 58. Chang, S., Kwon, O. S., Bang, S. K., Kim, D. H., Baek, M. W., Ryu, Y., ... & Kim, H. Y. (2019). Peripheral sensory nerve tissue but not connective tissue is involved in the action of acupuncture. Frontiers in neuroscience, 13, 110.
- 59. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. Anatomy of CNS opioid receptors. Trends Neurosci. 1988; 11:308–14.
- 60. Sehgal, N., Smith, H. S., & Manchikanti, L. (2011). Peripherally acting opioids and clinical implications for pain control. Pain physician, 14(3), 249.
- 61. Ughreja, R. A., Venkatesan, P., Gopalakrishna, D. B., & Singh, Y. P. (2021). Effectiveness of myofascial release on pain, sleep, and quality of life in patients with fibromyalgia syndrome: A systematic review. Complementary Therapies in Clinical Practice, 45, 101477.
- 62. New AJA, Acad Y, Biophys B, Mol A, Res C, Yaksh TL. Spinal systems and pain processing : development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. 1999;20(August):811–9.

- 63.North R, Egan T. Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. 1983. p. 71–5.
- 64. Stein C, Schäfer M, Machelska H. Attacking pain at its source : new perspectives on opioids. 2003;9(8):1003–8.
- 65. Bodnar RJ, Klein GE. Endogenous opiates and behavior: 2004. Peptides. 2005;26(12):2629–711.
- 66. Spetea, Mariana. "Opioid receptors and their ligands in the musculoskeletal system and relevance for pain control." Current pharmaceutical design 19.42 (2013): 7382-7390.
- 67.Bergström, Jonas, et al. "Opioid peptides and receptors in joint tissues: study in the rat." Journal of orthopaedic research 24.6 (2006): 1193-1199.
- 68. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. 2009.
- 69. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. Anatomy of CNS opioid receptors. Trends Neurosci. 1988; 11:308–14.
- 70. Spetea, Mariana. "Opioid receptors and their ligands in the musculoskeletal system and relevance for pain control." Current pharmaceutical design 19.42 (2013): 7382-7390.
- 71. Bergström, Jonas, et al. "Opioid peptides and receptors in joint tissues: study in the rat." Journal of orthopaedic research 24.6 (2006): 1193-1199.
- 72. Fine, P. G., Milano, R., & Hare, B. D. (1988). The effects of myofascial trigger point injections are naloxone reversible. Pain, 32(1), 15-20.
- Howlett, A. C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII.
 Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol. Rev. 54, 161–202 (2002)
- 74. Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacological reviews, 58(3), 389-462.
- 75. Guzman, M. (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. Nature reviews cancer, 3(10), 745-755.
- 76. Porter, A. C. & Felder, C. C. The endocannabinoid nervous system. Unique opportunities for therapeutic intervention. Pharmacol. Ther. 90, 45–60 (2001)

- 77. Herkenham, M. et al. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. J. Neurosci. 11, 563–583 (1991).
- Howlett, A. C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol. Rev. 54, 161–202 (2002).
- 79. Pandey, R., Mousawy, K., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. (2009). Endocannabinoids and immune regulation. Pharmacological research, 60(2), 85-92.
- Howlett, A. C., & Fleming, R. M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. Molecular pharmacology, 26(3), 532-538.
- 81. Caulfield, M. P., & Brown, D. A. (1992). Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108–15 neuroblastoma cells via a Pertussis toxinsensitive mechanism.
- 82. Seward, E., Hammond, C., & Henderson, G. (1991). μ-Opioid-receptormediated inhibidon of the N-type calcium-channel current. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 244(1310), 129-135.
- Takeda, M., Tanimoto, T., Ikeda, M., Kadoi, J., Nasu, M., & Matsumoto, S. (2004). Opioidergic modulation of excitability of rat trigeminal root ganglion neuron projections to the superficial layer of cervical dorsal horn. Neuroscience, 125(4), 995-1008.
- 84. Bushlin, I., Rozenfeld, R., & Devi, L. A. (2010). Cannabinoid–opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. Current opinion in pharmacology, 10(1), 80-86.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, sobre a reorganização miofascial (RMF) proposto nesse estudo, os achados sugerem que:

- A RMF realizada em camundongo causou redução da hiperalgesia mecânica em um modelo animal de dor nociceptiva de origem inflamatória realizado à distância do local da lesão.
- O tempo de 10 min. reproduziu efeito nas duas janelas temporais avaliadas, 24 h e 96 h.
- Há participação do sistema nervoso periférico na RMF avaliado em duas janelas de tempo 24 h e 96h.
- 4) Não houve redução do edema nas janelas temporais avaliadas (0 h, 1 h e 24 h).
- O efeito anti-hiperalgésico da RMF, é pelo menos em parte, mediado pelos sistemas opioide e canabinoide, tanto periféricos como central.
- Houve modulação do imunoconteúdo μ-opioide e CB₂ na fáscia toracolombar.
- Não houve alteração das citocinas pró- e anti-inflamatórias IL-1β, IL-6 e IL-10 nas amostra analisadas (fáscia toracolombar, pata e medula espinal).
- A RMF manteve o tecido fascial da região toracolombar sadio após realização da técnica e foi capaz de tornar o fibroblasto mais ativo.

Desta forma, as contribuições deste estudo são importantes não só para melhorar o suporte científico acerca do tema, mas para padronizar e propiciar maior segurança na aplicação de técnicas direcionadas ao sistema fascial realizadas à distância do local da lesão, que já são amplamente utilizada na prática clínica há muitos anos. Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos relacionados aos mecanismos endógenos de controle da dor, tempo de aplicação, analise de citocinas e comportamento celular. Os resultados da RMF aplicada à dor nociceptiva de origem inflamatória mostraram-se promissores, pelo fato de ser uma abordagem não farmacológica, de baixo custo e de fácil aplicação. É importante que estudos futuros possam ser realizados como ensaios clínicos, com o intuito de melhorar a compreensão desses achados em humanos.

REFERÊNCIAS

- Kondrup F, Gaudreault N, Venne G. The deep fascia and its role in chronic pain and pathological conditions: A review. Clin Anat [Internet].
 2022 Jul 1;35(5):649–59. Available from: https://doi.org/10.1002/ca.23882
- Langevin HM. Fascia mobility, proprioception, and myofascial pain. Life.
 2021;11(7).
- Organizers W, Sabri M, Health I, Cosponsors W, Health I. Neurocircuitry Manipulations. 2019;
- dos Santos Amorim M, Sinhorim L, Wagner J, de Paula Lemos F, Schleip R, Sonza A, et al. Acute effects of myofascial reorganization on trapezius muscle oxygenation in individuals with nonspecific neck pain. J Bodyw Mov Ther. 2022;29(October):286–90.
- Langevin HM, Bouffard NA, Badger GJ, Churchill DL, Howe AK. Subcutaneous tissue fibroblast cytoskeletal remodeling induced by acupuncture: Evidence for a mechanotransduction-based mechanism. J Cell Physiol. 2006;207(3):767–74.
- 6. Pratt RL. Hyaluronan and the fascial frontier. Int J Mol Sci. 2021;22(13).
- 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.
- 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 [Internet]. 2013;255:110–21. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.055
- Ajimsha MS, Binsu D, Chithra S. Effectiveness of myofascial release in the management of plantar heel pain: A randomized controlled trial. Foot [Internet]. 2014;24(2):66–71. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foot.2014.03.005
- Sinhorim L, Amorim MDS, Ortiz ME, Bittencourt EB, Bianco G, da Silva FC, et al. Potential nociceptive role of the thoracolumbar fascia: A scope review involving in vivo and ex vivo studies. J Clin Med. 2021;10(19).

- Suarez-rodriguez V, Fede C, Pirri C, Petrelli L, Loro-ferrer JF, Rodriguezruiz D, et al. Fascial Innervation: A Systematic Review of the Literature. Int J Mol Sci. 2022;23(10).
- Fede C, Albertin G, Petrelli L, Sfriso MM, Biz C, De Caro R, et al. Expression of the endocannabinoid receptors in human fascial tissue. Eur J Histochem. 2016;60(2):130–4.
- Steffen D, Baar K. Effects of Loading and Nutrition on Fascia. 2021. 115– 127 p.
- Bordoni B, Myers T. A Review of the Theoretical Fascial Models: Biotensegrity, Fascintegrity, and Myofascial Chains. Cureus. 2020;12(2).
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. (6th ed.). Philadelphia: Saunders Company.; 1999.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Cell. 2010;140(6):771–6.
- Gallin JI, Ralph S, Barton F H, Douglas T F, Nathan Carl F, Wilkins Williams L. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Wilkins LW&, editor. 1999. 1335 p.
- Sherwood ER, Toliver-kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. 2004;18(3):385–405.
- Rocha SM, Garcia LJ. Chemical Mediators of the Acute Inflammatory Reaction: International Series. Oxford. 1972. 425 p.
- Ferreira SH, Moncada S, Vane JR. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. Br J Pharmacol. 1997;120(4):399–400.
- 21. Kim PK, Deutschman CS. Inflammatory responses and mediators. Surg Clin North Am. 2000;80(3):885–94.
- Nourshargh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: A key regulator of leukocyte phenotype and function. Trends Immunol. 2005;26(3):157–65.
- Roitt RI. Fundamentos de imunologia. 12 ed. Koogan G, editor. Rio de Janeiro; 2013. 552 p.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 2004;25(12):677–86.

- 25. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. Periodontol 2000. 2013;63(1):149–64.
- Woolf CJ. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. 2004;441–51.
- 27. McMahon SB, Cafferty WBJ, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. Exp Neurol. 2005;192(2):444–62.
- 28. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? Nat Neurosci.2002;5(11s):1062–7.
- 29. Ji R-R, Xu Z-Z, Gao Y-J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. Nat Rev Drug Discov. 2014;13(7):533–48.
- Flecknell P. Analgesia from a veterinary perspective. Br J Anaesth. 2008;101(1):121–4.
- Antunes MIPP, Moreno K, Grumadas CES. Avaliação e manejo da dor em cães e gatos com câncer - Revisão. Arq Cienc Vet Zool Unipar, Umuarama. 2008;11(2):113–9.
- Oliveira BH, Horewicz VV, Silva, Rafaela Hardtda SALM DCC, Salgado A, Filho FJC, Bobinski F, et al. ET-B receptors involvement in peripheral opioid analgesia induced by light-emitting diode photobiomodulation in male and female mice. J Photochem Photobiol B Biol. 2020;
- 33. França MED, Sinhorim L, Martins DF, Schleip R, Machado-Pereira NAMM, de Souza GM, et al. Manipulation of the Fascial System Applied During Acute Inflammation of the Connective Tissue of the Thoracolumbar Region Affects Transforming Growth Factor-β1 and Interleukin-4 Levels: Experimental Study in Mice. Front Physiol. 2020;11(December):1–12.
- Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. Neuroscience [Internet]. 2012;211:39–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041
- Rosas RF, Emer AA, Batisti AP, Ludtke DD, Turnes BL, Bobinski F, et al. Far infrared-emitting ceramics decrease Freund's adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in mice through cytokine modulation and activation of peripheral inhibitory neuroreceptors. J Integr Med [Internet]. 2018;16(6):396–403. Available from: https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.08.002

- Martins DF, Turnes BL, Cidral-Filho FJ, Bobinski F, Rosas RF, Danielski LG, et al. Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. Neuroscience [Internet]. 2016;324:485–95. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.035
- Mazzardo-Martins L, Salm DC, Winkelmann-Duarte EC, Ferreira JK, Lüdtke DD, Frech KP, et al. Correction to: Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I (Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, (2018), 470, 12, (1815-1827),. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2018;470(12):1829.
- 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.
- Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schäfer M, et al.
 Opioid Peptide expressing Leukocytes. 2001;(2):500–8.
- 40. Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. Pain. 2020;161(9):1976–82.
- 41. Chimenti RL, Frey-Law LA, Sluka KA. A mechanism-based approach to physical therapist management of pain. Phys Ther. 2018;98(5):302–14.
- Perrot S, Cohen M, Barke A, Korwisi B, Rief W, Treede RD. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic secondary musculoskeletal pain. Pain. 2019;160(1):77–82.
- Siddall B, Ram A, Jones MD, Booth J, Perriman D, Summers SJ. Shortterm impact of combining pain neuroscience education with exercise for chronic musculoskeletal pain: a systematic review and meta-analysis. Pain. 2022;163(1):e20–30.
- 44. Henschke N, Kamper SJ, Maher CG. The epidemiology and economic consequences of pain. Mayo Clin Proc [Internet]. 2015;90(1):139–47. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.09.010
- 45. Machado LAC, Telles RW, Benseñor I, Barreto SM. Prevalence of Pain and Associated Factors in Brazilian Civil Servants: an Introductory

Analysis Using Baseline Data From the Elsa-Brasil Cohort. 2019;4:550– 550.

- Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA. An overview of animal models of pain: Disease models and outcome measures. J Pain [Internet]. 2013;14(11):1255–69. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2013.06.008
- Liu XH, Wu G, Dan Shi D, Zhu R, Zeng HJ, Cao B, et al. Effects of nitric oxide on notexin-induced muscle inflammatory responses. Int J Biol Sci. 2015;11(2):156–67.
- Langevin HM, Bishop J, Maple R, Badger GJ, Fox JR. Effect of Stretching on Thoracolumbar Fascia Injury and Movement Restriction in a Porcine Model. Am J Phys Med Rehabil. 2018;97(3):187–91.
- Paxton JZ, Hagerty P, Andrick JJ, Baar K. Optimizing an intermittent stretch paradigm using ERK1/2 phosphorylation results in increased collagen synthesis in engineered ligaments. Tissue Eng - Part A. 2012;18(3–4):277–84.
- 50. Kandel ER. Princípios da neurociências. Porto Alegre; 2014.
- 51. Tracey WD. Nociception. Curr Biol. 2017;27(4):R129–33.
- Garland EL. Pain Processing in the Human Nervous System. A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathways. Prim Care - Clin Off Pract. 2012;39(3):561–71.
- 53. Bordoni B, Marelli F, Morabito B, Cavallaro F, Lintonbon D. Fascial preadipocytes: Another missing piece of the puzzle to understand fibromyalgia? Open Access Rheumatol Res Rev. 2018;10:27–32.
- Pace MC, Passavanti MB, de Nardis L, Bosco F, Sansone P, Pota V, et al. Nociceptor plasticity: A closer look. J Cell Physiol. 2018;233(4):2824– 38.
- Reisine T, Law SF, Blake A, Tallent M. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. Ann N Y Acad Sci. 1996;780:168–75.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Review series Central modulation of pain. J Clin Invest. 2010;120(11):3779–87.
- 57. Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn.2010;11(december).

- Melzack R, Wall P. Pain Mechanisms: A New Theory. Science (80-). 1965;971–8.
- 59. Williams A, Craig K. Updating the definition of pain. Int Assoc Study Pain.2016;
- Strigo IA, Bud Craig AD. Interoception, homeostatic emotions and sympathovagal balance. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2016;371(1708).
- 61. Seeley WW. The Salience Network: A Neural System for Perceiving and Responding to Homeostatic Demands. J Neurosci. 2019;39(50):9878–82.
- 62. Grimm K, Lamont L, Tranquilli W, Greene S, Robertson S. Veterinary anesthesia and analgesia. The fifth. 2015. 584–616 p.
- Mckune M, Murrell J, Nolan A, White K, Wright B. Nociception and pain. Veterinary anesthesia and analgesia - The fifth edition of Lumb and Jones. Hoboken: Wiley-Blackwell. 2015;584–616.
- Macintyre PE, Walker S, Power I, Schug SA. Editorial I: Acute pain management: Scientific evidence revisited. Br J Anaesth. 2006;96(1):1–4.
- Crean D, Godson C. Specialised lipid mediators and their targets. Semin Immunol [Internet]. 2015;27(3):169–76. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.05.002
- Ringkamp M, Meyer RA. Physiology of Nociceptors. Senses A Compr Ref. 2008;5:97–114.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. Nature. 2001;413(6852):203–10.
- 68. Melzack R. From the gate to the neuromatrix. Pain. 1999;
- Goodman, Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10th ed. Rio de janeiro; 2005. 427–464 p.
- Foley KM, Inturrisi CE. Analgesic drug therapy in cancer pain: Principles and practice. Med Clin North Am [Internet]. 1987;71(2):207–32. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30866-5
- 71. New AJA, Acad Y, Biophys B, Mol A, Res C, Yaksh TL. Spinal systems and pain processing : development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. 1999;20(August):811–9.
- Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R. Farmacologia. 6^a ed. Elsevier, editor.
 Rio de Janeiro; 2007. 588-609. p.
- 73. Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in chronic pain. Eur J Pharmacol.

2001;429(1–3):79–91.

- 74. Baamonde A, Lastra A, Villazón M, Bordallo J, Hidalgo A, Menéndez L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004;369(2):245–51.
- Vetter I, Kapitzke D, Hermanussen S, Monteith GR, Cabot PJ. The Effects of pH on Beta-Endorphin and Morphine Inhibition of Calcium Transients in Dorsal Root Ganglion Neurons. J Pain. 2006;7(7):488–99.
- Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue Distribution of Opioid Receptor Gene Expression in the Rat. 1996;881:877–81.
- 77. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia.2009;(Figure 1).
- North R, Egan T. Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. 1983. p. 71–5.
- Stein C, Schäfer M, Machelska H. Attacking pain at its source : new perspectives on opioids. 2003;9(8):1003–8.
- Bodnar RJ, Klein GE. Endogenous opiates and behavior: 2004. Peptides. 2005;26(12):2629–711.
- Spetea M. Opioid Receptors and Their Ligands in the Musculoskeletal System and Relevance for Pain Control [Internet]. Vol. 19, Current Pharmaceutical Design. 2013. p. 7382–90. Available from: http://www.eurekaselect.com/article/50063
- Bergström J, Ahmed M, Li J, Ahmad T, Kreicbergs A, Spetea M. Opioid peptides and receptors in joint tissues: study in the rat. J Orthop Res. 2006;24(6):1193–9.
- Bodnar RJ, Klein GE. Endogenous opiates and behavior: 2005. Peptides. 2006;27(12):3391–478.
- 84. Millan MJ. Descending control of pain. Prog Neurobiol. 2002;
- Iwaszkiewicz KS, Schneider JJ, Hua S. Targeting peripheral opioid receptors to promote analgesic and anti-inflammatory actions. Front Pharmacol. 2013;4(OCT):1–7.
- Zhou LI, Zhang QIN, Stein C, Scha M. Contribution of Opioid Receptors on Primary Afferent Versus Sympathetic Neurons to Peripheral Opioid Analgesia. 1998;286(2):1000–6.
- Ingram SL, Williams JT. Opioid inhibition of Ih via adenylyl cyclase. Neuron. 1994;13(1):179–86.
- Wall D MR (Ed.). Text Book of Pain. 3rd ed. Churchill-Livingstone, editor. Londres; 1994. 45–56 p.
- Zollner CZ, Shaqura MA, Bopaiah CP, Mousa S, Stein C, Afer MSCH.
 Painful Inflammation-Induced Increase in □ -Opioid Receptor Binding and G-Protein Coupling in Primary Afferent Neurons. 2003;64(2):202–10.
- Handal KA, Schauben JL, Salamone FR. Naloxone. Ann Emerg Med. 1983;12(7):438–45.
- 91. Kirk T, Ahmed A, Rognoni E. Fibroblast memory in development, homeostasis and disease. Cells. 2021;10(11).
- Gosling AP. Mecanismos de ação e efeitos da fisioterapia no tratamento da dor. Rev Dor. 2012;13:65–70.
- Ballantyne JC. Opioids for the Treatment of Chronic Pain: Mistakes Made, Lessons Learned, and Future Directions. Anesth Analg. 2017;125(5):1769–78.
- 94. Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. Nat Neurosci. 2005;8(5):585–9.
- 95. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. Nat Rev Drug Discov. 2004;3(9):771–84.
- Guzmán M. Cannabinoids: Potential anticancer agents. Nat Rev Cancer. 2003;3(10):745–55.
- 97. Stein C, Machelska H. Modulation of Peripheral Sensory Neurons by the Immune System : Implications for Pain Therapy. 2011;63(4):860–81.
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002;68–69:619–31.
- Veldhuis NA, Poole DP, Grace M, Mcintyre P, Bunnett NW. The G Protein

 Coupled Receptor Transient Receptor Potential Channel Axis :
 Molecular Insights for Targeting Disorders of Sensation and Inflammation.
 2015;(January):36–73.
- Anand P, Whiteside G, Fowler CJ, Hohmann AG. Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. Brain Res Rev [Internet]. 2009;60(1):255–66. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.003

- 101. C. S, M. P, A. Y, J. H, K. L, C. W. No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. J Clin Invest [Internet]. 1996;98(3):793–9. Available from: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed6&N EWS=N&AN=26349185
- 102. Stein C, Gramsch C, Herz A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: Local opioid receptors and β-endorphin. J Neurosci. 1990;10(4):1292–8.
- 103. Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: Regulation of localand global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. Vol. 212, Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology. 2012. 1–115 p.
- Garcia JBS, Cardoso MG de M, Dos-Santos MC. Opioids and the immune system: clinical relevance. Rev Bras Anestesiol. 2012;62:713–8.
- Ajimsha MS, Shenoy PD, Gampawar N. Role of fascial connectivity in musculoskeletal dysfunctions: A narrative review. J Bodyw Mov Ther [Internet]. 2020;24(4):423–31. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2020.07.020
- 106. Adstrum S, Hedley G, Schleip R, Stecco C, Yucesoy CA. Defining the fascial system. J Bodyw Mov Ther [Internet]. 2017;21(1):173–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbmt.2016.11.003
- Gatt A, Agarwal S, Zito PM. Anatomy, fascia layers. StatPearls;
 StatPearls Publ Treasure Island, FL, USA. 2021;
- Klingler W, Velders M, Hoppe K, Pedro M, Schleip R. Clinical relevance of fascial tissue and dysfunctions. Curr Pain Headache Rep. 2014;18(8).
- McKenney K, Elder AS, Elder C, Hutchins A. Myofascial release as a treatment for orthopaedic conditions: A systematic review. J Athl Train. 2013;48(4):522–7.
- 110. Stecco C, Sfriso MM, Porzionato A, Rambaldo A, Albertin G, Macchi V, et al. Microscopic anatomy of the visceral fasciae. J Anat. 2017;231(1):121–
 8.
- 111. Fede C, Pirri C, Fan C, Petrelli L, Guidolin D, De Caro R, et al. A closer look at the cellular and molecular components of the deep/muscular fasciae. Int J Mol Sci. 2021;22(3):1411.

- 112. Kumbhare D, Shaw S, Ahmed S, Noseworthy M. Quantitative ultrasound of trapezius muscle involvement in myofascial pain: Comparison of clinical and healthy populations using texture analysis. Ann Phys Rehabil Med [Internet]. 2018;61:e429. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.rehab.2018.05.1001
- 113. Williams P. Gray's anatomy. 38th ed. 1995.
- 114. Schleip R, Gabbiani G, Wilke J, Naylor I, Hinz B, Zorn A, et al. Fascia is able to actively contract and may thereby influence musculoskeletal dynamics: a histochemical and mechanographic investigation. Front Physiol. 2019;336.
- 115. McCombe D, Brown T, Slavin J, Morrison WA. The histochemical structure of the deep fascia and its structural response to surgery. J Hand Surg Am. 2001;26 B(2):89–97.
- 116. Bhattacharya V, Barooah PS, Nag TC, Chaudhuri GR, Bhattacharya S. Detail microscopic analysis of deep fascia of lower limb and its surgical implication. Indian J Plast Surg. 2010;43(2):135–40.
- Follonier L, Schaub S, Meister J-J, Hinz B. Myofibroblast communication is controlled by intercellular mechanical coupling. J Cell Sci. 2008;121(20):3305–16.
- Dawidowicz J, Matysiak N, Szotek S, Maksymowicz K. Telocytes of fascial structures. Telocytes. 2016;403–24.
- Hernández Jiménez AK, Yáñez Ocampo BR, Esquivel Chirino CA. Fascia lata as an alternative in dental treatments. Rev odontológica Mex. 2017;21(4):273–9.
- 120. Chen T, Zhang Y, Dong Y, Zhang D, Xia L, Sun X, et al. Mast cell and heparin promote adipogenesis in superficial fascia of rats. Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Biol Lipids. 2021;1866(11):159024.
- 121. Zhang D, Dong Y, Zhang Y, Su X, Chen T, Zhang Y, et al. Spatial distribution and correlation of adipocytes and mast cells in superficial fascia in rats. Histochem Cell Biol. 2019;152(6):439–51.
- Fede C, Albertin G, Petrelli L, Sfriso MM, Biz C, De Caro R, et al. Hormone receptor expression in human fascial tissue. Eur J Histochem. 2016;60(4):224–9.
- 123. Myers TW. Trilhos anatômicos: meridianos miofasciais para terapeutas

- Lewit K, Olsanska S. Clinical importance of active scars: Abnormal scars as a cause of myofascial pain. J Manipulative Physiol Ther. 2004;27(6):399–402.
- Chaitow L. Terapia Manual para Disfunção Fascial. Artmed. Porto Alegre;
 2017.
- 126. Altomare M, Monte-Alto-Costa A. Manual Mobilization of Subcutaneous Fibrosis in Mice. J Manipulative Physiol Ther [Internet]. 2018;41(5):359– 62. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jmpt.2017.10.011
- 127. Menon RG, Oswald SF, Raghavan P, Regatte RR, Stecco A. T1ρmapping for musculoskeletal pain diagnosis: Case series of variation of water bound glycosaminoglycans quantification before and after fascial manipulation® in subjects with elbow pain. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(3):1–10.
- 128. Fuller R. Tensile-integrity structures: US Patent 3063521. 1962;
- 129. Chen YH, Chai HM, Shau YW, Wang CL, Wang SF. Increased sliding of transverse abdominis during contraction after myofascial release in patients with chronic low back pain. Man Ther [Internet]. 2014;23:69–75. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2015.10.004
- 130. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. Nat Rev Mol cell Biol. 2009;10(1):75–82.
- Kapandji A-I. Le système conjonctif, grand unificateur de l'organisme. Ann Chir Plast esthètique. 2012;57(5):507–14.
- 132. Ingber DE. Ingber The architecture of life. Sci Am. 1997;
- 133. Levin SM. Putting the shoulder to the wheel: a new biomechanical model for the shoulder girdle. Biomed Sci Instrum. 1997;33:412–7.
- Levin SM. Continuous tension, discontinuous compression: a model for biomechanical support of the body. Bull Struct Integr. 1982;8(1).
- 135. Levin SM. The icosahedron as the three-dimensional finite element in biomechanical support. In: Proceedings of the Society of General Systems Research Symposium on Mental Images, Values and Reality, 1986 May 26. 1986.
- 136. Levin SM, Martin D-C. Biotensegrity. Fascia Tens Netw Hum Body.

2012;(December 2012):137-42.

- Ingber DE. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. Prog Biophys Mol Biol. 2008;97(2–3):163–79.
- Lima L, Jesus ID, Lima IA, Ermida IV, Pacheco IA. Mecanotransdução : Importância de Impor Stress na Reparação Tecidual Mechanotransduction : The Importance of Stress. 2017;29(5):33–9.
- 139. Guimberteau JC, Bakhach J, Panconi B, Rouzaud S. A fresh look at vascularized flexor tendon transfers: concept, technical aspects and results. J Plast Reconstr Aesthetic Surg. 2007;60(7):793–810.
- Schleip R, Müller DG. Training principles for fascial connective tissues: Scientific foundation and suggested practical applications. J Bodyw Mov Ther. 2013;17(1):103–15.
- 141. Nugent GE, Aneloski NM, Schmidt TA, Schumacher BL, Voegtline MS, Sah RL. Dynamic shear stimulation of bovine cartilage biosynthesis of proteoglycan 4. Arthritis Rheum. 2006;54(6):1888–96.
- 142. Hayashi M, Zhao C, Thoreson AR, Chikenji T, Jay GD, An K-N, et al. The effect of lubricin on the gliding resistance of mouse intrasynovial tendon. PLoS One. 2013;8(12):e83836.
- 143. Kapacee Z, Richardson SH, Lu Y, Starborg T, Holmes DF, Baar K, et al. Tension is required for fibripositor formation. Matrix Biol. 2008;27(4):371–
 5.
- Stecco A, Gesi M, Stecco C. Fascial Components of the Myofascial Pain Syndrome. 2013;
- 145. Voermans NC, Bönnemann CG, Huijing PA, Hamel BC, van Kuppevelt TH, de Haan A, et al. Clinical and molecular overlap between myopathies and inherited connective tissue diseases. Neuromuscul Disord. 2008;18(11):843–56.
- 146. Blyth FM, Briggs AM, Schneider CH, Hoy DG, March LM. The global burden of musculoskeletal pain—where to from here? Am J Public Health. 2019;109(1):35–40.
- 147. Ackermann PW, Spetea M, Nylander I, Ploj K, Ahmed M, Kreicbergs A. An opioid system in connective tissue: a study of achilles tendon in the rat. J Histochem Cytochem. 2001;49(11):1387–95.
- 148. Fine PG, Milano R, Hare BD. The effects of myofascial trigger point

149

injections are naloxone reversible. Pain. 1988;32(1):15–20.

- 149. Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M, Buechner S, Rufli T. Expression of μ-opiate receptor in human epidermis and keratinocytes. J Invest Dermatol. 1998;111(2):297–301.
- 150. Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi PL. Mu-opiate receptor and Beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin. Dermatology. 2004;209(3):183–9.
- 151. Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Brozyna AA, Granese J, Pisarchik A, et al. Regulated proenkephalin expression in human skin and cultured skin cells. J Invest Dermatol. 2011;131(3):613–22.
- 152. Schaible HG. Pathophysiology of pain. Orthopade. 2007;36(1):8–10.
- 153. Schaible H-G. Peripheral and central mechanisms of pain generation. In: Analgesia. Springer; 2006. p. 3–28.
- 154. McPartland JM. Expression of the endocannabinoid system in fibroblasts and myofascial tissues. J Bodyw Mov Ther. 2008;12(2):169–82.
- 155. Gamelin FX, Aucouturier J, Iannotti FA, Piscitelli F, Mazzarella E, Aveta T, et al. Effects of chronic exercise on the endocannabinoid system in Wistar rats with high-fat diet-induced obesity. J Physiol Biochem. 2016;72(2):183–99.
- 156. Langevin HM, Nedergaard M, Howe AK. Cellular control of connective tissue matrix tension. J Cell Biochem. 2013;114(8):1714–9.
- 157. Borg-Stein J, Simons DG. Myofascial pain. Arch Phys Med Rehabil.2002;83(3 SUPPL. 1):40–7.
- 158. Fede C, Porzionato A, Petrelli L, Fan C, Pirri C, Biz C, et al. Fascia and soft tissues innervation in the human hip and their possible role in post-surgical pain. J Orthop Res. 2020;38(7):1646–54.
- 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.
- 160. Berrueta L. STRETCHING IMPACTS INFLAMMATION RESOLUTION IN CONNECTIVE TISSUE. Physiol Behav. 2018;176(5):139–48.
- Barnes J. Myofascial Release: A Comprehensive Evaluatory and Treatment Approach. In: Paoli, Pennsylvania: Myofascial Release Seminars. 1990.

- Travell JG, Simons DG. Myofascial pain and dysfunction: the trigger point manual. Vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins; 1992.
- 163. Ajimsha MS, Al-Mudahka NR, Al-Madzhar JA. Effectiveness of myofascial release: Systematic review of randomized controlled trials. J Bodyw Mov Ther [Internet]. 2015;19(1):102–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbmt.2014.06.001
- 164. Jędrzejewski G, Kasper-Jędrzejewska M, Dolibog P, Szyguła R, Schleip R, Halski T. The Rolf Method of Structural Integration on Fascial Tissue Stiffness, Elasticity, and Superficial Blood Perfusion in Healthy Individuals: The Prospective, Interventional Study. Front Physiol. 2020;11.
- Silva AS. O efeito da indução miofascial suboccipital no sistema nervoso autónomo. [sn]; 2014.
- 166. Sinhorim L, Amorim M, Torres LJ, Wagner J, Niza NT. Acute effect of myofascial reorganization of the trapezius muscle in peripheral muscle oxygenation in asympomatic subjects – a case series . 2019;(April):1–7.
- 167. Schleip R, Klingler W, Lehmann-Horn F. Active fascial contractility: Fascia may be able to contract in a smooth muscle-like manner and thereby influence musculoskeletal dynamics. Med Hypotheses. 2005;65(2):273–7.
- 168. 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 [Internet]. 2009;14(5):531–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.math.2008.09.001
- 169. Corey SM, Vizzard MA, Bouffard NA, Badger GJ, Langevin HM. Stretching of the back improves gait, mechanical sensitivity and connective tissue inflammation in a rodent model. PLoS One. 2012;7(1).
- 170. Rodríguez-Fuentes I, De Toro FJ, Rodríguez-Fuentes G, De Oliveira IMH, Meijide-Faílde R, Fuentes-Boquete IM. Myofascial release therapy in the treatment of occupational mechanical neck pain: A randomized parallel group study. Am J Phys Med Rehabil. 2016;95(7):507–15.
- 171. Rodríguez-Huguet M, Gil-Salú JL, Rodríguez-Huguet P, Cabrera-Afonso JR, Lomas-Vega R. Effects of Myofascial Release on Pressure Pain Thresholds in Patients with Neck Pain: A Single-Blind Randomized Controlled Trial. Am J Phys Med Rehabil. 2018;97(1):16–22.
- 172. Arguisuelas MD, Lisón JF, Doménech-Fernández J, Martínez-Hurtado I,

Salvador Coloma P, Sánchez-Zuriaga D. Effects of myofascial release in erector spinae myoelectric activity and lumbar spine kinematics in nonspecific chronic low back pain: Randomized controlled trial. Clin Biomech [Internet]. 2019;63(January 2018):27–33. Available from: https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2019.02.009

- Laimi K, Mäkilä A, Bärlund E, Katajapuu N, Oksanen A, Seikkula V, et al. Effectiveness of myofascial release in treatment of chronic musculoskeletal pain: a systematic review. Clin Rehabil. 2018;32(4):440– 50.
- 174. 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 [Internet]. 2018;26(2):55–65. Available from: https://doi.org/10.1080/10669817.2017.1322736
- 175. López-Torres O, Mon-López D, Gomis-Marzá C, Lorenzo J, Guadalupe-Grau A. Effects of myofascial release or self-myofascial release and control position exercises on lower back pain in idiopathic scoliosis: A systematic review. J Bodyw Mov Ther. 2021;27:16–25.
- 176. Gil AC. Como elaborar projetos de pesquisa. 6th ed. Atlas, editor. São Paulo; 2018.
- 177. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. J Cereb Blood Flow Metab. 2020;40(9):1769–77.
- Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. ILAR J. 2002;43(4):244–57.
- 179. Daniel W. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences.9th ed. New York; 2008.
- 180. Buffon AC, Javornik MA, Heymanns AC, Salm DC, Horewicz V V, Martins DF, et al. Role of the endocannabinoid system on the antihyperalgesic action of gabapentin in animal model of neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation. An Acad Bras Cienc. 2020;92.
- 181. Montrucchio DP, Córdova MM, Soares Santos AR. Plant derived aporphinic alkaloid S-(+)-dicentrine induces antinociceptive effect in both acute and chronic inflammatory pain models: evidence for a role of

TRPA1 channels. PLoS One. 2013;8(7):e67730.

- 182. de Oliveira BH, Horewicz VV, da Silva RH, Salm DC, Salgado ASI, Cidral-Filho FJ, et al. ET-B receptors involvement in peripheral opioid analgesia induced by light-emitting diode photobiomodulation in male and female mice. J Photochem Photobiol B Biol. 2021;214:112104.
- 183. Cunha N de S, Sinhorim L, Schleip R, Zomkowski K, Santos GM, Sperandio FF. Effects of myofascial reorganization associated with kinesiotherapy on chronic pain and functionality of breast cancer survivors: development of a study protocol. Fisioter em Mov. 2022;35(SPE).
- 184. Bienfait M. Fáscias e pompages. Summus Editorial, editor. 1999.
- Prentice W. Fisioterapia na prática esportiva: uma abordagem baseada em competências. 14 ed. 2012.
- Ingber DE. Tensegrity and mechanotransduction. J Bodyw Mov Ther.
 2008;12(3):198–200.

ANEXO 1 – Parecer CEUA





Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 03 de dezembro de 2019

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "OS EFEITOS DA REORGANIZAÇÃO MIOFASCIAL APLICADA A APONEUROSE TORACOLOMBAR NA HIPERALGESIÁ EM CAMUNDONGOS MACHOS COM INFLAMAÇÃO NA PATA: ANÁLISE DO PAPEL DOS RECEPTORES OPIOIDES E CANABINOIDES.", registrada com o nº 19.049.2.07.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, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi <u>aprovado</u> pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 09 de dezembro de 2019.

Finalidade	🗆 Ensino 🛛 Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	03/2019 a 03/2022	
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico, swiss	
N° de animais	264	
Peso/Idade	35-40g, 40/60	
Sexo	Não consta	
Origem	Biotério da Universidade federal de Santa Catarina- UFSC	

Prof. Sandro Melin Sgrott Coordenador da Comissão

UNISUL - *Campus* Grande Florianópolis, Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária, CEP 88137-270, Palhoça, SC. Fone: (48) 3279-1036 / E-mail: ceua@unisul.br

ANEXO 2 – Guia ARRIVE



The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

The ARRIVE Essential 10 These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings. Section/line number, or reason Item Recommendation for not reporting Study design For each experiment, provide brief details of study design including: The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). Sample size 2 Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. Explain how the sample size was decided. Provide details of any a priori sample size calculation, if done. Inclusion and 3 Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) exclusion during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established a priori. If no criteria were set, state this explicitly criteria For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. For each analysis, report the exact value of n in each experimental group. Randomisation State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and 4 treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly. Blindina 5 Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis). Outcome 6 Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, measures or behavioural changes). For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size. Statistical Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software methods used. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met. Experimental 8 Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and animals substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.

Experimental procedures	 9 For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: What was done, how it was done and what was used. When and how often. Where (including detail of any acclimatisation periods). Why (provide rationale for procedures). 	
Results	10 For each experiment conducted, including independent replications, report: Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). If applicable, the effect size with a confidence interval.	

The Recommended Set

These items complement the Essential 10 and add important context to the study. Reporting the items in both sets represents best practice.

ltem	Recommendation	Section/line number, orreason for not reporting
Abstract	11Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.	
Background	12Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.	
Objectives	13Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.	
Ethical statement	14Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.	
Housing and husbandry	15Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.	
Animal care and monitoring	 16Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering and distress. Report any expected or unexpected adverse events. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this. 	
Interpretation/ scientific implications	17Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. Comment on the study limitations including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results.	
Generalisability/ translation	18Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).	
Protocol registration	19Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.	
Data access	20Provide a statement describing if and where study data are available.	
Declaration of interests	21Declare any potential conflicts of interest, including financial and non-financial. If none exist, this should be stated. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis and reporting of the study.	

N C 3 R^s National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research

www.ARRIVEguidelines.org

ANEXO 3 - Produção científica durante o período do doutoramento

<u>3.1 - Tese premiada pelo Findley Fellowship 2022</u> https://fasciaresearchsociety.org/findley_fellowship.php

3.2 - Artigo publicado:



https://doi.org/10.17784/mtprehabjournal.2019.17.739

CASE REPORT

Acute effect of myofascial reorganization of the trapezius muscle in peripheral muscle oxygenation in asympomatic subjects – a case series.

Larissa Sinhorim¹, Mayane Amorim¹, Laureani Jaques Torres², Janaína Wagner¹, Nathália Tiepo Niza¹, Francisco De Paula Lemos¹, Verônica Vargas Horewicz³ Anelise Sonza¹, Gilmar Moraes Santos¹.







Manipulation of the Fascial System Applied During Acute Inflammation of the Connective Tissue of the Thoracolumbar Region Affects Transforming Growth Factor- β 1 and Interleukin-4 Levels: Experimental Study in Mice

OPEN ACCESS

Edited by: George Grant, University of Aberdeen, United Kinadom

Reviewed by:

Frank Willard, University of New England, United States Carla Stacco, University of Padua, Italy Gulsah Ozsoy, Selçuk University, Turkey Jan Dommerholt, Bethesda Physiocare, United States Maria Elisa Duarte França¹, Larissa Sinhorim^{1,2}, Daniel Fernandes Martins², Robert Schleip^{3,4*}, Nicolas A. M. M. Machado-Pereira¹, Gabriel Melo de Souza¹, Verônica Vargas Horewicz^{2†} and Gilmar Moraes Santos^{1†}

¹ Posture and Balance Laboratory (LAPEQ), College of Health Sciences and Sports, Santa Catarina State University (UDESC), Florianópolis, Brazil, ² Neurosciences Experimental Laboratory (LANEX), Postgraduate Program in Health Sciences (PPGCS), University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Brazil, ³ Department of Sport and Health Sciences, Associate Professorship of Conservative and Rehabilitative Orthopedics, Technical University of Munich, Munich, Germany, ⁴ Department for Medical Professions, DIPLOMA Hochschule Bad Sooden-Allendorf, Bad Sooden-Allendorf, Germany





Review

Potential Nociceptive Role of the Thoracolumbar Fascia: A Scope Review Involving In Vivo and Ex Vivo Studies

Larissa Sinhorim ^{1,2}^(D), Mayane dos Santos Amorim ^{1,3}, Maria Eugênia Ortiz ^{1,2}, Edsel Balduino Bittencourt ^{1,4}, Gianluca Bianco ^{1,5,6}^(D), Fabiana Cristina da Silva ⁷^(D), Verônica Vargas Horewicz ^{1,2}^(D), Robert Schleip ^{8,9,*}^(D), William R. Reed ^{10,11}^(D), Leidiane Mazzardo-Martins ¹²^(D) and Daniel F. Martins ^{1,2}^(D)

Journal of Bodywork & Movement Therapies xxx (xxxx) 1–5



Fascia Science and Clinical Applications

Acute effects of myofascial reorganization on trapezius muscle oxygenation in individuals with nonspecific neck pain

Mayane dos Santos Amorim MSc^a, Larissa Sinhorim MSc^{a, b}, Janaína Wagner^a, Francisco de Paula Lemos^a, Robert Schleip PhD^{c, d}, Anelise Sonza PhD^a, Gilmar Moraes Santos PhD^{a,*}

College of Health Sciences and Sports at Santa Catarina State University (UDESC), Physical Therapy Department, Posture and Balance Laboratory (LAPEQ), Florianópolis, SC, Brazil

^b Postgraduate Program in Health Sciences (PPGCS) and Neurosciences Experimental Laboratory (LANEX), University of Southern Santa Catarina, Palhoça, SC, Brazil ^c Associate Professorship of Conservative and Rehabilitative Orthopaedics, Department of Sport and Health Sciences, Technical University of Munich, Germany ^d DIPLOMA Hochschule Bad Sooden-Allendorf, Germany

3.3 - Artigo Aceito:

Fisioter. Mov., 2022, v. 35, Ed Esp, e35609 DOI:10.1590/fm.2022.35609

SPECIAL ISSUE: WOMEN'S HEALTH Original Article

Effects of myofascial reorganization associated with kinesiotherapy on chronic pain and functionality of breast cancer survivors: development of a study protocol

Abstract

3.4 - Artigo em rocesso de submissão:

Peripheral muscle oxygenation, pain, and disability index in individuals with and without nonspecific neck pain, before and after myofascial reorganization: a double-blind randomized controlled trial

Mayane dos Santos Amorim¹, MSc; Larissa Sinhorim^{1,2}, MSc; Janaína Wagner¹; Francisco de Paula Lemos¹; Maria Elisa Duarte França¹, MSc; Robert Schleip^{3,4*}, PhD; <u>Anelise</u> Sonza¹, PhD; <u>Gilmar Moraes</u> Santos^{1*}, PhD

1 College of Health Sciences and Sports at Santa Catarina State University (UDESC). Posture and Balance Laboratory (LAPEQ), <u>Florianópolis</u>-SC, Brazil.

 2 Postgraduate Program in Health Sciences (PPGCS) and Neurosciences Experimental Laboratory (LANEX), University of Southern Santa Catarina, Palhoca-SC, Brazil.
 3 Associate Professorship of Conservative and Rehabilitative Orthopaedics, Department of Sport and Health Sciences, Technical University of Munich, Germany.

4 DIPLOMA Hochschule Bad Sooden-Allendorf, Germany.

These authors contributed equally to this work. Corresponding author: <u>*robert.schleip@tum.de</u>

1 Myofascial release strategies and technique recommendations for athletic 2 performance: a systematic review 3 4 5 Running title: Myofascial release strategy for athletic performance 6 7 8 Maria Elisa Duarte França^a*, Mayane dos Santos Amorim^a, Larissa Sinhorim^a, Raquel 9 Fleiga, Gilmar Moraes Santosa, Iramar Baptistella do Nascimentoa. 10 11 ^a Santa Catarina State University, Brazil 12