



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA - UNISUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS
RÔMULO NOLASCO DE BRITO

**IMERSÃO EM ÁGUA TERMOMINERAL REDUZ DOR NEUROPÁTICA EM
CAMUNDONGOS E IMUNOCONTEÚDO DE BDNF E NOS2 NA MEDULA
ESPINAL**

Palhoça
2020

B87 Brito, Rômulo Nolasco de, 1978-
Imersão em água termomineral reduz dor neuropática em
camundongos e imunoconteúdo de BDNF e NOS2 na medula espinal
/ Rômulo Nolasco de Brito. – 20210.
76 f. : il. color.; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-
graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins
Coorientação: Prof.^a Dr.^a Verônica Vargas Horewicz

1. Balneologia. 2. Dor crônica. 3. Hidroterapia. 4. Águas termais.
5. Lesão nervosa. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Horewicz,
Verônica Vargas. III. Universidade do Sul de Santa Catarina. IV.
Título.

CDD (21. ed.) 615.853

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215

RÔMULO NOLASCO DE BRITO

**IMERSÃO EM ÁGUA TERMOMINERAL REDUZ DOR NEUROPÁTICA EM
CAMUNDONGOS E IMUNOCONTEÚDO DE BDNF E NOS2 NA MEDULA
ESPINAL**

LINHA DE PESQUISA: Neurociências

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

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Co-orientadora: Verônica Vargas Horewicz, Dra.

Palhoça

2020

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

Imersão em água termomineral reduz dor neuropática em camundongos e
imunoconteúdo de BDNF e NOS2 na medula espinal

RÔMULO NOLASCO DE BRITO

AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 02 de outubro de 2020.

Doutor Daniel Fernandes Martins (orientador) 

Doutor António Pedro Pinto Cantista (avaliador externo – Universidade do
Porto/Portugal) – *presente por videoconferência*

Doutor Fernando Hellmann (avaliador externo – UFSC) – *presente por videoconferência*

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (avaliador interno – PPGCS) – *presente por
videoconferência*

Doutora Franciane Bobinski (avaliador interno - PPGCS) – *presente por videoconferência*



Professor Doutor Jefferson Luiz Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Dedicatória

Dedico este trabalho, fonte de estudo e de pré-conhecimento, a todos os seres que na eminente presença e no anonimato permitem que a ciência evolua em prol do desenvolvimento da humanidade e na busca constante às repostas dos fenômenos que ainda não conhecemos e nem compreendemos verdadeiramente.

AGRADECIMENTOS

À Providência Divina, à Verdade, ao amparo e proteção Espiritual e à Vida.

À minha origem terrena Familiar, em especial ao meu pai José Paulo de Brito (*in memoriam*), à minha mãe Carime Feres Nolasco de Brito e aos meus irmãos Daniel e Joyce. Ao Sr. Ênio, D. Ignez, Jorge, Jaqueline, Maria, Érica e Cláudio pela torcida e apoio desde o início.

À minha esposa Márcia Inês Werle Juchem, que além de ser uma grande companheira, juntamente com sua personalidade, empreendedorismo, autenticidade, apoio, trabalho, compreensão, amor e carinho pode sempre me encorajar, me apoiar nesta realização do estudo. Ao meu filho Victor Juchem de Brito que apesar da jovem idade sempre valorizou este processo e como dedicado e estudioso que é, por muitas, e muitas vezes me motivou a seguir em frente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins por ser muito mais que um orientador. Pois de fato é. Faz jus ao substantivo. Com maestria ímpar, deu o tom à condução da tese, dos estudos, dos experimentos que me permitiram entender o processo e hoje com mais experiência perceber que além da orientação, existe algo muito além que apenas pesquisadores e profissionais como você são capazes de proporcionar, tornando seus orientandos e alunos ainda mais motivados e melhores naquilo que precisam executar. Gratidão por todas as experiências e oportunidades que surgiram a partir do seu trabalho, da tua expertise, do ser humano que és e por ter sido o elo condutor para a materialização desta jornada do doutorado.

À minha coorientadora, Dr. Verônica Vargas Horewicz pela sua nobre contribuição durante o processo e pelo zelo e dedicação ao processo textual, experimental e de análise bioquímica.

À equipe do LaNEx, colaboradores, professores, alunos, bolsistas, mestrandos e doutorandos que direta e indiretamente fizeram parte da fundação e edificação deste trabalho. Em especial àqueles que estiverem inteiramente envolvidos com as diversas etapas do estudo: Profa. Dra. Franciane Bobinski, Daiana Salm, Daniela Ludkte, Sarah Van Den Berge, Bruna Hoffmann de Oliveira, Tainá de Oliveira Galassi, Paula Franson Fernandes, Julia Maio e Julia Koerich.

Ao Sr. Edar da Silveira, que no pleno exercício de seu trabalho, demonstrou-se muito zelo, pontualidade, dedicação, respeito e compromisso com a rotina de coleta e transporte dos volumes de água termomineral que foram utilizados nas etapas experimentais deste trabalho.

Aos amigos que conviveram de perto todo este processo. Destaque ao caríssimo amigo e Prof. Dr. Luiz Augusto Belmonte, o meu muito obrigado pelas conversas, resenhas, prospecções, projetos e realizações.

Aos colegas, alunos, professores que de uma forma ou de outra transitaram por momentos importantes da minha vida e que em conjunto com curso do doutorado, estavam ao meu lado neste grande desafio de estudar, pesquisar, trabalhar e lecionar. Aos profissionais, professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) e do Curso de Fisioterapia da UNISUL.

Aos(as) companheiros(as) da Associação Brasileira de Fisioterapia Aquática (ABFA), associação esta que temos a grande oportunidade de estar como presidente, fundador e ser uma das nossas motivações em continuar estudando a imersão, a cinesioterapia na água para o pleno desenvolvimento da especialidade de Fisioterapia Aquática.

Aos que pude ver e saber e aos que não vi e nem soube, mas que auxiliarem na execução deste trabalho.

Ao incentivo dado pela Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL aos professores para a realização do Strictu Sensu, como a bolsa de 50% do valor do curso.

E carinhosamente à minha condição de professor e fisioterapeuta, favoráveis para que eu seja o profissional que sou com a percepção necessária para continuar firme e forte nesta caminhada.

Água

Da água, existimos!

A água trouxe saúde desde a infância e na adolescência

A água deu energia e entusiasmo para ir além nos estudos e conhecer sua plena relação com o movimento

A água apresentou com três títulos acadêmicos que só são importantes porque qualificaram na assistência e nas relações humanas. Na cura!

A água que apresentou às mentes brilhantes e deu amigos inesquecíveis

A água que acaricia a pele, que faz sentir, movimentar aquilo que parecia inerte

A água que esquentava o coração e turbilhona o metabolismo

A água que faz flutuar os pensamentos e sentimentos, acalmando a mente

A água que silenciosamente age nas mais íntimas relações sistêmicas

A água que invade células, alegras as ações e alivia a dor

A água, da periferia ao centro, é Divino elemento, luminoso fluido que nos trouxe até aqui e nos levará ao conhecimento ainda não compreendido e que nos traz esperança de novas descobertas em prol de todos.

Água, gratidão a você!!!

(Rômulo Nolasco de Brito, 2/7/2020)

RESUMO

Introdução: Nas últimas décadas, a imersão em águas termominerais (IATM) também conhecido como balneoterapia (BT) ou termalismo tem sido utilizada para promoção da saúde e no tratamento de distúrbios osteomusculares, processos inflamatórios e crônicos. Estudos recentes demonstraram os efeitos de processos crônicos, como no tratamento da dor lombar crônica, mas não analisaram os mecanismos envolvidos no alívio da dor, em particular a dor neuropática (DN), comum nesses indivíduos com dor lombar. **Objetivo:** este estudo investigou o efeito anti-hiperalgésico da BT em um modelo animal de dor neuropática. **Métodos:** Os animais (camundongos swiss machos adultos 25-35g de peso corporal), foram operados por meio de ligadura parcial do nervo isquiático, induzindo DN. O tratamento com imersão em água termomineral (IATM) (35°C) foi realizado em ambiente experimental controlado; o filamento von Frey (vF) e o peso do corpo foram utilizados para avaliar a hiperalgesia mecânica (dor neuropática); a força de agarrar da pata traseira foi medida usando um dinamômetro digital; fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) usando método ELISA, isoforma NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e a isoforma induzida (iNOS ou NOS2) foram quantificados por imunoeletoforese. **Resultados:** Nossos achados mostram que a BT reduziu de forma efetiva a hiperalgesia mecânica, preveniu a diminuição do peso corporal dos animais e aumento do imunoconteúdo de BDNF e NOS2 na medula espinal, enquanto aumentou o imunoconteúdo de BDNF e NOS1 na pele da pata. Não foram observados efeitos da BT ou da LPNI no imunoconteúdo de TrkB na medula espinal e na pele da pata. O conjunto de experimentos demonstra pela primeira vez um efeito analgésico da BT na água termal da nascente natural de Santo Amaro da Imperatriz-Brasil em um modelo de dor neuropática em murinos. **Conclusão:** O presente estudo fornece dados experimentais in vivo importantes, baseados no modelo murino de dor neuropática, para estabelecer os efeitos da BT na água termal de nascentes naturais de Santo Amaro da Imperatriz-Brasil por abordagem metodológica, usando testes funcionais e análises bioquímicas. Além disso, nossos estudos em animais fornecem evidências experimentais de efeitos favoráveis da água de Santo Amaro da Imperatriz que podem ser utilizadas clinicamente em pacientes com dor neuropática. No entanto, futuros ensaios clínicos devem ser incentivados para testar a eficácia da BT em pacientes com dor neuropática.

Descritores: Balneoterapia; dor crônica; hidroterapia; águas termais; lesão nervosa

ABSTRACT

Introduction: In the last decades, immersion in thermal mineral waters (ATM) also known as balneotherapy (BT) or thermalism has been used for health promotion and in the treatment of musculoskeletal disorders, inflammatory and chronic processes. Recent studies have demonstrated the effects of chronic processes, such as in the treatment of chronic low back pain, but have not analyzed the mechanisms involved in pain relief, in particular neuropathic pain (DN), common in these individuals with low back pain. **Objective:** this study investigated the anti-hyperalgesic effect of BT in an animal model of neuropathic pain. **Methods:** The animals were operated using partial sciatic nerve connection, inducing DN. The treatment with immersion in thermomineral water (IATM) (35°C) was carried out in a controlled experimental environment; the von Frey filament (vF) and body weight were used to assess mechanical hyperalgesia (neuropathic pain); the gripping strength of the hind leg was measured using a digital dynamometer; brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neuronal NOS isoform (nNOS or NOS1), induced (iNOS or NOS2) were quantified by immunoelectrophoresis. **Results:** Our findings show that BT effectively reduced mechanical hyperalgesia, prevented the animals' body weight from decreasing and increased the BDNF and NOS2 immunocontent in the spinal cord, while increasing the BDNF and NOS1 immunocontent in the paw skin. No effects of BT or LPNI were observed on TrkB immunocontent in the spinal cord and paw skin. The set of experiments demonstrates for the first time an analgesic effect of BT in the thermal water of the natural spring of Santo Amaro da Imperatriz-Brasil in a model of neuropathic pain in murines. **Conclusion:** The present study provides important in vivo experimental data, based on the murine model of neuropathic pain, to establish the effects of BT on the thermal water of natural springs in Santo Amaro da Imperatriz-Brasil by methodological approach, using functional tests and biochemical analyzes. In addition, our animal studies provide experimental evidence of favorable effects of Santo Amaro da Imperatriz water that can be observed clinically in patients with neuropathic pain. However, future clinical trials should be encouraged to test the effectiveness of BT in patients with neuropathic pain.

Keywords: balneology, chronic pain, hydrotherapy, thermal water, nerve injury.

LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas

AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ATM – Águas termominerais

BDNF – fator neurotrófico derivado do encéfalo

BKCa – canais de cálcio ativados pelo potássio de alta condutância

BT – Balneoterapia

CEPE - Centro de Estudos de Psicobiologia e Exercício da Universidade de São Paulo

CEUA – Comissão de ética uso de animais

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COFFITO – Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional

CPME – Corno posterior da medula espinal

CS – Células de Schwann

DN – Dor neuropática

DW – Degeneração Walleriana

ET-_B – receptor para endotelina B

eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

GABA – ácido γ-amino butírico

GC-S - Guanilil ciclase solúvel

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

GSNE – Gânglio sensorial do nervo espinal

IAQ - Imersão em águas quentes

IATM – Imersão em água termomineral

IFN- γ – interferon gama

IL-1β – interleucina-1

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida

LaNEx – Laboratório de Neurociências Experimental

LNP – Lesão nervosa periférica

LPNI – Ligadura parcial do nervo isquiático

NADPH – Nicotinamida Adenine Dimecleotide Phosphate

NMDA – N-metil-D-Aspartato

NO – Óxido Nítrico

NOS – óxido nítrico sintase
 p75NTR – Receptor de Neurotrofina p75
 PIC's – Práticas integrativas e complementares
 PNPIC – Política Nacional das práticas integrativas e complementares
 CB₂ - receptores canabinoides do tipo 2
 SBED – Sociedade Brasileira de Estudo da Dor
 SDRC-I – Síndrome da dor regional complexa tipo 1
 SN - Sistema nervoso
 SNC – Sistema nervoso central
 SNP – Sistema nervoso periférico
 TM – Termalismo
 TNF - Fator de Necrose Tumoral
 TrkB – receptor de tirosina cinase B
 UBS – Unidade básica de saúde
 UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de Quadros

Quadro 1 – Determinação dos grupos para o experimento da etapa 1.....	45
Quadro 2 – Determinação dos grupos para o experimento da etapa 2.....	46
Quadro 3 - Determinação dos grupos para o experimento da etapa 3.....	46
Quadro 4 –Determinação dos grupos para o experimento da etapa 4.....	46

Lista de figuras

Figura 1 – Esquema temporal do processo envolvendo a ação glial na dor neuropática.....	21
Figura 2 – Exemplos de modelos experimentais de lesões nervosas.....	23
Figura 3 – Diagrama de camadas da pele e expressões das isoformas NOS...	31
Figura 4 - Vasodilatação cutânea após 30min de aquecimento.....	35
Figura 5 - Delineamento do estudo.....	47
Figura 6 – Ambiente e imersão.....	49
Figura 7 – Administração de gabapentina.....	50
Figura 8 – Ilustrações referentes à aplicação do von Frey.....	51

Figura 9 – Equipamento e aproximação do animal para registro da força.....	52
---	----

Lista de tabelas

Tabela 1 – Diferenças entre as NOS.....	27
Tabela 2 - Respostas fisiológicas da imersão.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
1.1.1 Aspectos conceituais e epidemiológicos da dor.....	18
1.1.2 Conceito e fisiopatologia da dor neuropática.....	19
1.1.3 Modelos animais de dor neuropática	22
1.1.4 Dor neuropática e o fator neurotrófico derivado do encéfalo	24
1.1.5 Papel do óxido nítrico e suas isoformas na dor neuropática.....	26
1.1.5.1 Função do óxido nítrico na pele.....	30
1.1.6 O papel do queratinócito na dor neuropática	31
1.1.7 Fluxo sanguíneo da pele e termorregulação.....	33
1.1.8 Imersão, termalismo, balneoterapia e águas termominerais.....	35
1.1.8.1 Spa terapia.....	37
1.1.8.2 Balneoterapia.....	37
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 OBJETIVO GERAL.....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3 MÉTODOS.....	44
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	44
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	44
3.3 ANIMAIS.....	45
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	45
3.5 TESTES.....	47
3.5.1 Indução da neuropatia por meio da ligadura parcial do nervo isquiático.....	47
3.5.2 Tratamento com imersão em ATM.....	48
3.5.3 Tratamento com gabapentina.....	49
3.5.4 Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	50
3.5.5 Avaliação da força muscular.....	51
3.5.6 Western blotting de BDNF, TrkB, NOS1 e NOS2 em pata e medula espinal.....	52
3.6 MORTE INDOLOR ASSISTIDA (MIA)	53

3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	54
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	54
3.9 ASPECTOS ÉTICOS.....	55
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO A – Parecer de aprovação do projeto na CEUA UNISUL.....	81
ANEXO B – Composição provável das águas utilizadas no estudo.....	84

1. INTRODUÇÃO

A lesão de um nervo pode resultar de traumas como: lacerações, lesões penetrantes, alongamento excessivo, isquemia ou feridas de balas; ou compressão repetitiva (síndromes de túnel) ou causas iatrogênicas como: cirurgias ortopédicas, plásticas, neurocirúrgicas bem como por outros procedimentos cirúrgicos como a ressecção oncológica^{1,2}. Como resposta à lesão, importantes eventos celulares e moleculares são iniciados, determinando respostas secundárias que originam por sua vez, o principal sintoma da lesão nervosa periférica (LNP): a DN. A DN é um estado de dor crônica causado por um dano ou doença no sistema nervoso somatossensorial³. Especificamente, a DN é caracterizada por dor na ausência de um estímulo nocivo e pode ser espontânea (contínua ou paroxística) em suas características temporais ou ser evocada por estímulos sensoriais como alodinia mecânica, que se caracteriza pela presença de dor como consequência do toque leve na pele⁴.

O tratamento farmacológico da DN envolve geralmente o uso de medicamentos antidepressivos tricíclicos e antiepilépticos⁵, sendo os opioides reservados somente a pacientes com dor refratária. A primeira escolha, portanto, para os casos de DN são os medicamentos antidepressivos tricíclicos. Quando não há resposta ao tratamento, devem ser associados antiepilépticos tradicionais (como a gabapentina) e morfina. No entanto, um alto número de pacientes abandona o tratamento por ocorrência de efeitos colaterais, tais como sonolência e problemas cognitivos decorrentes do uso desses medicamentos. Neste sentido, há uma busca incessante por novas abordagens para o tratamento da DN, que sejam mais efetivas e que causem pouco ou nenhum efeito colateral⁶.

Apesar da alta prevalência de DN, ela é frequentemente reconhecida e inadequadamente tratada devido à sua natureza complexa⁷. Assim, levando em consideração os aspectos etiológicos isquêmicos e traumáticos das neuropáticas periféricas, tem sido demonstrado que os sistemas endógenos endotelinérgico e nitrérgicos, além de participarem da manutenção do tônus vascular sistêmico e periféricos, eles também estão implicados na produção e modulação da DN.

O óxido nítrico (NO) é um vasodilatador potente com propriedade de agregação plaquetária produzido por uma variedade de células, incluindo células endoteliais, músculo liso vascular, macrófagos e células neuronais⁸. A formação de NO é

catalisada a partir de L-arginina por uma dioxigenase dependente de NADPH, denominada NO sintase (NOS). Existem três isoformas diferentes de NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS) que geram diferencialmente o NO de uma maneira dependente do tipo de tecido⁹. Todas as três isoformas de NOS, bem como o seu produto final, o NO, têm efeito modulador sobre a dor neuropática. A superativação do receptor de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e a formação de peroxinitrito resulta em altos níveis de nNOS e eNOS sugerindo que essas isoformas são críticas para a hipersensibilidade dolorosa. Embora, altas concentrações de NO no local da lesão mostram efeitos nociceptivos, baixas concentrações de NO tem efeitos antinociceptivos¹⁰.

Além disso, nas várias formas de lesão de nervos, medula espinal ou encéfalo aumenta o BDNF nas regiões afetadas¹¹. No SNC, ele é produzido e secretado por neurônios, micróglia e astrócitos¹². O BDNF periférico, por sua vez, também pode se originar de células T ativadas ou células B, monócitos¹³, macrófagos¹⁴, mastócitos¹¹, plaquetas¹⁵, bem como de células de Schwann¹⁶. Após lesão nervosa, o BDNF inicia mecanismos compensatórios contra os efeitos deletérios da lesão¹⁷. Isto é feito através do aumento dos impulsos sinápticos excitatórios nos neurônios excitatórios¹⁸. Nesse processo, o BDNF promove crescimento, desenvolvimento, sinaptogênese, diferenciação, sobrevivência e neurogênese. Através desses efeitos, portanto, o BDNF tem o potencial de facilitar a recuperação de lesões nervosas traumáticas¹⁹.

Com base na fisiopatologia explicada acima, terapias que aumentem o aporte sanguíneo local e sistêmico têm sido recentemente usadas nas LNP²⁰ sentido, na fisioterapia utiliza-se recursos ou abordagens eletrotermofototerapêuticas, como também a opção do uso da imersão em águas termominerais (ATM) por meio da balneoterapia (BT), crenoterapia e termalismo (TM) social²¹. Essas abordagens não farmacológicas ditas integrativas têm ganhado espaço nos ambientes médicos voltados para o manejo da dor. Principalmente na maioria dos países europeus, essas terapias são amplamente prescritas pelos médicos e preferidas pelos cidadãos europeus para o tratamento de dores crônicas²². No Brasil, pela grande quantidade de instâncias termominerais, a BT é frequentemente realizada. BT é definida como o uso de banhos (em banheiras ou piscinas) contendo água termomineral e/ou mineral a partir de fontes naturais ou poços perfurados²³.

Os efeitos da BT sobre dores inflamatórias tem sido o foco principal dos estudos com a BT, como foi demonstrado em revisão sistemática, estudos duplo-cegos onde

se comparou os efeitos da BT com água quente da torneira na osteoartrite (OA) do joelho²⁴ e na artrite reumatóide²⁵. Nosso grupo de pesquisa também verificou propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antioxidantes da água termomineral de Santo Amaro da Imperatriz-SC em um modelo de dor inflamatória persistente²³. Por outro lado, em outros estudos controlados, mas não duplo-cegos, BT ambulatorial também foi efetiva no alívio da dor em pacientes com dor crônica lombar²⁶ e fibromialgia²⁷. O que nos desperta interesse é o fato que essas duas últimas condições dolorosas possuem geralmente um componente doloroso de origem neuropática, assim esses estudos sugerem que a BT pode ser efetiva na redução da dor neuropática. Apesar do uso da BT induzir uma série de reações neuroendócrinas produzindo efeitos anti-inflamatórios e analgésicos²¹ o efeito da BT no tratamento da dor crônica de origem neuropática ainda não foi diretamente estudado.

Ressalta-se, que a falta de evidências científicas dos efeitos terapêuticos das ATM é um dos motivos que elas sejam subutilizadas. Além disso, as práticas terapêuticas não farmacológicas são reconhecidas pelo Ministério da Saúde do Brasil através da Portaria do Ministério da Saúde n.971/2006 – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), pelo Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional (COFFITO) pela Resolução COFFITO 380/2010^{28,29}. A própria PNPIC, recomenda o fomento de pesquisas sobre tais práticas - sua eficácia e resolutividade, tal como esta pesquisa se constitui. Tal feito, é determinante para o reconhecimento ainda mais amplo destas práticas integrativas e complementares (PIC's) bem como do acesso seguro da população.

Ratifica-se que há grande incentivo do Ministério da Saúde para a implantação destas terapias no Sistema único de Saúde (SUS), e ao fato que atualmente há poucas evidências dos efeitos benéficos de tais terapias. Diante disso, fornecer informações sobre o tempo de tratamento, bem como informações adicionais sobre os mecanismos relacionados a dor crônica neuropática são de profunda valia para o desenvolvimento de um tratamento preventivo e curativo eficaz, bem como, para uma abordagem terapêutica mais adequada. Nossa hipótese é que os efeitos benéficos da BT na dor inflamatória possam também ser observados na dor neuropática. Sendo assim, considerando os achados aqui apontados pela literatura, bem como dos motivos e relevância citados acima formulou-se a seguinte questão problema: Quais os efeitos da BT no tratamento da dor neuropática e o possível papel dos sistemas nitrgico e do BDNF?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Aspectos conceituais e epidemiológicos da dor

A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a lesão real ou potencial ou descrita em termos de tal dano^{4,30,31}. Cada indivíduo aprende a utilizar esse termo através das suas experiências anteriores. Segundo informações da Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED) a dor continua sendo uma das grandes preocupações da humanidade, de tal forma que uma das motivações da ciência persiste ainda em esclarecer as razões que justifiquem sua ocorrência e os procedimentos destinados ao seu controle²³. Destaca-se, que a dor resulta em alto custo econômico e social afetando pelo menos 30% dos indivíduos, onde entre 10 a 40% deles, apresentam dor com duração superior a um dia. A dor é a principal causa de sofrimento, prejuízo laboral e funcional evoluindo para sequelas psicossociais e econômicas³².

Considerando a duração da sua manifestação, ela pode ser de três tipos: aguda, crônica e persistente. No que diz respeito à dor crônica, em especial, é citada como tendo uma duração prolongada, que pode se estender de vários meses a vários anos e que está quase sempre associada a um processo de doença crônica. A dor crônica pode também pode ser consequência de uma lesão já previamente tratada, como por exemplo, dor ocasionada pela artrite reumatoide, dor relacionada a esforços repetitivos durante o trabalho e dor por câncer³³. No mundo entre 7 e 40% da população apresenta dor crônica e aproximadamente 50 a 60% desses indivíduos são parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida³⁴. Segundo dados epidemiológicos levantados no Brasil, a prevalência de dor crônica em Unidades Básicas de Saúde (UBS) é de 30%³⁵. A dor é uma questão de saúde pública também no Brasil. Estima-se ainda que 50% das pessoas que estejam medicadas, estão insatisfeitas com os resultados³⁵.

O manejo da dor crônica ainda continua a ser uma questão desafiadora para clínicos e pesquisadores. A Academia Americana de Medicina da Dor reportou que a dor crônica afeta mais americanos do que o diabetes, as doenças cardíacas e o câncer combinados³⁶.

A dor fisiológica apresenta um propósito importante, alertando sobre lesões ou estímulo potencialmente nocivos. A dor crônica, no entanto, é mais complexa. Embora as pessoas pensem na dor como uma sensação puramente física, a dor apresenta fatores físicos e psicológicos³⁶. Neste sentido, uma nova classificação da dor foi proposta considerando os descritores já conhecidos como: dor nociceptiva e dor neuropática, porém incluindo um terceiro descritor - dor nociplástica. O propósito desta nova caracterização se dá pelo fato de que achados clínicos e psicológicos sugerem que há alteração da nocicepção, apesar de não haver sinais claros de danos teciduais ou evidência de doença e lesão em casos de dor crônica³¹.

Por definição, a dor nociceptiva é a que surge de dano real ou potencial ao tecido não neural e é causada pela ativação de nociceptores. A dor neuropática é causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial. A dor nociplástica é a que surge da nocicepção alterada, apesar de não haver evidência de dano tecidual real ou potencial causando a ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial causando a dor. Essa dor é devida a distúrbios do processamento central da dor, por exemplo: por um aumento na excitabilidade ou uma diminuição da inibição³¹.

A dor nociceptiva, nociplástica e neuropática pode não responder igualmente a vários tratamentos, portanto, a compreensão dos mecanismos subjacentes ajudará a orientar as escolhas de tratamento direcionadas a esses mecanismos³⁷.

Neste sentido, para melhor entendimento, nesta tese, a dor que foi estudada e tratada é a DN e na sequência é descrito o conceito, fisiopatologia, modelos animais, DN e BDNF, DN e NO, queratinócito e DN.

1.1.2. Conceito e fisiopatologia da dor neuropática

Em 1994, a DN foi definida como “dor iniciada ou causada por lesão primária, disfunção ou perturbação transitória do SNP ou SNC”⁴. Dezanove anos depois, uma nova versão da definição de DN foi publicada como “dor causada por lesão ou doença do sistema somatossensorial”³⁸. O sistema somatossensorial permite a percepção do toque, pressão, dor, temperatura, posição, movimento e vibração. Os nervos somatossensoriais surgem na pele, mucosa, músculos, articulações, ossos e fáscia e incluem termorreceptores, mecanorreceptores, quimiorreceptores, pruriceptores e nociceptores que enviam sinais para a medula espinal ou tronco encefálico, chegando

a centros superiores de processamento da informação. A maioria dos processos sensoriais envolve um núcleo talâmico que recebe um sinal sensorial que é então direcionado para o córtex cerebral. Lesões ou doenças do sistema nervoso somatossensorial podem levar à transmissão alterada e desordenada de sinais sensoriais na medula espinal, tronco encefálico e no encéfalo. Neste sentido, condições comuns associadas à dor neuropática incluem neuralgia pós-herpética, neuralgia do trigêmeo, radiculopatia dolorosa, neuropatia diabética, infecção por HIV, hanseníase, amputação, dor por lesão de nervo periférico e acidente vascular encefálico (na forma de dor pós- acidente vascular encefálico)³.

Pesquisas no campo da dor têm se concentrado na compreensão das mudanças plásticas no sistema nervoso após a lesão do nervo, identificando novos alvos terapêuticos e facilitando a transferência de conhecimento de modelos animais para a prática clínica. Múltiplas são as causas da dor neuropática e os estudos pré-clínicos e clínicos tem construído enormemente para o avanço do conhecimento sobre a fisiopatologia da dor neuropática³.

A neuropatia periférica altera as propriedades elétricas dos nervos sensoriais causando desequilíbrios entre a sinalização central excitatória e inibitória, de modo que os interneurônios inibitórios e os sistemas de controle descendente são comprometidos. Por sua vez, a transmissão de sinais sensoriais e os sistemas de desinibição ou facilitação são alterados ao nível dos neurônios do corno posterior da medula espinal (CPME). De fato, estudos pré-clínicos mostraram várias alterações anatômicas, moleculares e eletrofisiológicas desde a periferia até o sistema nervoso central (SNC), que produzem um ganho de função, fornecendo conhecimento acerca da dor neuropática e seu tratamento³⁹.

Um dos principais eventos envolvidos no aumento da excitabilidade dos neurônios nociceptivos espinais é a sensibilização central. Ela é gerada a partir do aumento da excitabilidade de neurônios espinais produzida pela resposta aumentada a muitas modalidades sensoriais, permitindo fibras (mecanossensíveis) de baixo limiar ativar neurônios nociceptivos de segunda ordem^{39,40}. Em particular, a descarga contínua de fibras aferentes periféricas com liberação concomitante de aminoácidos excitatórios e neuropeptídeos leva a alterações pós-sinápticas em neurônios nociceptivos de segunda ordem, como um excesso de sinalização devido à fosforilação do NMDA e receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Essas mudanças de segunda ordem explicam plausivelmente a alodinia

física. A hiperexcitabilidade também pode ser causada pela perda de interneurônios inibitórios liberadores de ácido γ -aminobutírico (GABA) que também pode mudar para exercer consequentemente ações excitatórias nos neurônios espinais⁴¹. Além disso, há alterações funcionais menos bem compreendidas em células não neuronais da medula espinal, como micróglia e astrócitos, que contribuem para o desenvolvimento de hipersensibilidade⁴². Para melhor compreensão do papel das células gliais na dor neuropática ver figura 1 abaixo.

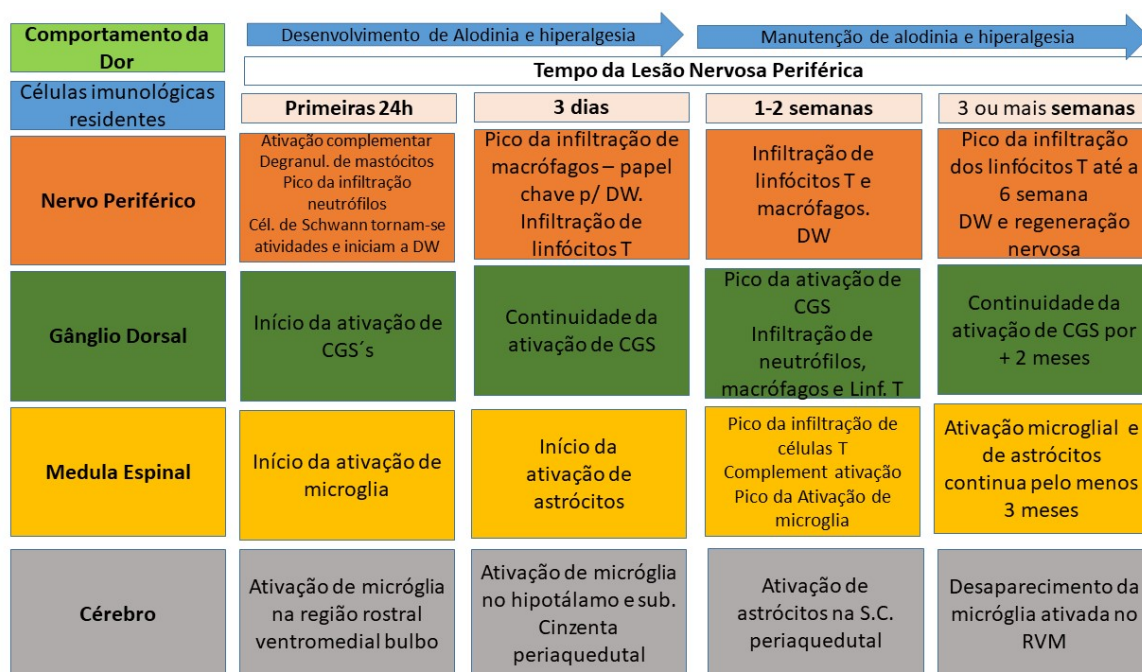


Figura 1 – Esquema temporal do processo envolvendo a ação glial na dor neuropática.

Fonte: Adaptado de Austin & Taylor, 2013⁴³. CGS'S – células gliais; DW – degeneração walleriana; RVM – região rostral ventromedial do bulbo; SC – células de schwann; linf. – linfócitos; sub. – substância.

Na periferia, medula espinal e encéfalo, um ganho de excitação e facilitação e uma perda de inibição são aparentes. Essas mudanças deslocam as vias sensoriais para um estado de hiperexcitabilidade, e uma sequência de mudanças ao longo do tempo da periferia para o cérebro pode contribuir para que o estado de DN se torne crônico. Na DN as vias noradrenérgicas descendentes inibitórias da dor, mediadas pelos receptores adrenérgicos α_2 na medula espinal, são atenuadas e o aumento da sinalização das vias serotoninérgicas que agem por meio dos receptores para serotonina torna-se dominante. Em humanos, o sistema noradrenérgico medeia a modulação da dor condicionada, que em animais é chamado de controle inibitório nocivo difuso, na qual uma dor inibe a outra por meio da ativação de vias

descendentes. Em seres humanos e animais com neuropatias, esses controles são perdidos ou pelo menos parcialmente prejudicados⁴³.

A atividade ectópica em fibras aferentes primárias pode ter um papel fundamental na fisiopatologia da dor neuropática após lesão do nervo periférico. Pacientes com lesão traumática do nervo periférico demonstraram redução total da dor espontânea e evocada ipsilateral quando tratado com um bloqueador (lidocaína) do nervo periférico⁴⁴. Uma lesão traumática em um nervo causa alterações nos seus canais iônicos (sódio, cálcio e potássio), que podem incluir todos os tipos de fibras aferentes afetando o processamento nociceptivo na medula espinal e no encéfalo. Por exemplo, o aumento da expressão e função dos canais de sódio nos terminais centrais (medula espinal) dos nervos sensoriais, bem como o aumento da expressão da subunidade $\alpha_2\delta$ de canais de cálcio, levam ao aumento da excitabilidade, transdução de sinal e liberação de neurotransmissores. Quando ocorre a ruptura (descontinuidade) de uma fibra aferente da periferia devido a uma lesão, haverá perda sensorial. No entanto, os remanescentes das fibras no local da lesão podem gerar atividade ectópica (por exemplo, um neuroma de fibras C) e, portanto, dor⁴⁵. As fibras intactas remanescentes são hiperexcitáveis, chamadas de nociceptores irritáveis⁴⁶. Como resultado, o paciente pode sentir dor contínua, dormência e dores evocadas.

No geral, a hiperexcitabilidade subjacente na dor neuropática resulta de alterações na função e expressão de canais iônicos, mudanças na função neuronal de neurônios nociceptivos de segunda ordem e alterações na função inibitória de interneurônios³.

1.1.3 Modelos animais de dor neuropática periférica

Existem inúmeros modelos experimentais disponíveis para estudar os mecanismos da DN periférica. Estes podem ser divididos em dois grupos principais: i) de acordo com a localização da lesão (raiz dorsal ou ventral, nervo espinal, gânglio sensorial do nervo espinal ou nervo periférico); ii) tipo de lesão (transecção, crioneurolise, ligadura apertada ou solta, esmagamento, estimulação com inflamação perineural, invasão de células tumorais ou radiação laser)⁴⁷.

A avaliação direta da DN em modelos animais não é possível devido à falta de comunicação verbal. Neste sentido, a determinação da presença de DN é realizada a partir da análise das mudanças no limiar de sensibilização da pele que são obtidas

por estímulos mecânicos e térmicos (alodinia mecânica e hiperalgesia térmica)⁴⁸. Atualmente, além destas avaliações, outros testes tentam avaliar o componente cognitivo e emocional, além do componente sensorial da dor, como o **grimace scale**⁴⁹, **mechanical conflict-avoidance**⁵⁰ e **scape avoidance**⁵¹. Contudo, esses testes ainda são pouco utilizados. A maioria dos modelos experimentais de DN são realizados no membro posterior do animal (rato / camundongo), com segmento da medula espinal que inerva o membro inferior compreendendo de L3 à L6. O nervo isquiático tem sua origem no segmento medular de L4-L5⁴⁸.

Atualmente os modelos de lesão nervosa experimental mais usados nos estudos são: transecção do nervo isquiático, lesão por constrição crônica, ligadura parcial do nervo isquiático (LPNI), lesão do nervo poupado, ligadura do nervo espinal segmentar (L5/L6)⁴⁷.

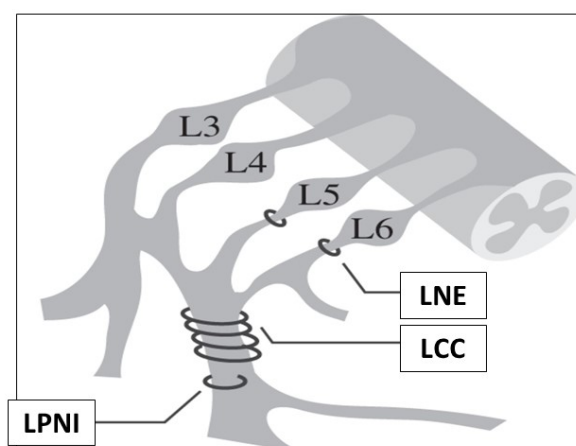


Figura 2 – Exemplos de modelos experimentais de lesão nervosa.

Legenda: LPNI – ligadura parcial do nervo isquiático; LNE – ligadura do nervo espinal; LCC – lesão constrição crônica. Fonte: Adaptado de Starowicz & Przewlocka, 2012⁵².

O modelo de LPNI corresponde ao procedimento experimental que envolve a ligadura do nervo isquiático ao nível da coxa de modo que 1/3 ou 1/2 do nervo isquiático é amarrado por uma ligadura apertada. Ratos submetidos a LPNI exibem sintomas de alodinia frente à estimulação com filamento de von Frey e hiperalgesia à estímulos térmicos e mecânicos dentro de horas após a ligadura, sendo que os sintomas duram por mais de 7 meses. Ratos com LPNI também apresentam sinais de dor espontânea em formas de proteção e lambidas na pata ipsilateral à lesão. A dor evocada pode evoluir para padrões bilaterais (sinal de sensibilização central). Este modelo de LPNI simula uma contusão nervosa em vez de compressão nervosa⁵³.

A utilização do modelo animal de LPNI nas pesquisas envolvendo dor neuropática, apresenta as seguintes vantagens: i) A desnervação parcial preserva algumas respostas comportamentais aos estímulos periféricos; ii) O dano é igual aos axônios de todos os tamanhos; iii) É um modelo de sintomas moderados de alodinia mecânica, alodinia ao frio e sintomas de hiperalgesia; iv) É um procedimento cirúrgico fácil e consome menos tempo quando comparado ao modelo de lesão do nervo espinal (LNE) e v) alta reprodutibilidade e facilidade de procedimento cirúrgico são duas vantagens importantes deste modelo⁵⁴.

No entanto, esse modelo também apresenta desvantagens, pois observa-se: i) a autotomia, que leva ao dano de dígitos das patas traseiras e torna o animal não adequado para o estudo; ii) Muita variabilidade na ligação do número de fibras nervosas por cada animal e até mesmo o experimentador não pode manter a consistência de ligadura de igual número de fibras nervosas todas as vezes; iii) Dificuldade de estudar mudanças no gânglio sensorial do nervo espinal (GSNE) pois as fibras aferentes primárias lesadas e não lesadas estão misturadas no nervo⁵⁴.

1.1.4 Dor neuropática e o fator neurotrófico derivado do encéfalo

As neurotrofinas como o fator de crescimento do nervo (NGF), o BDNF, a neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina-4 (NT-4) são classicamente conhecidas pelos seus efeitos na sobrevivência neuronal. Mais especificamente, elas são bem conhecidas por controlar o crescimento, ramificação axonal e dendrítica, estrutura sináptica, neurotransmissão e plasticidade sináptica⁵⁵. Em 1982 foi descoberta a segunda molécula desta família de neurotrofinas: o BDNF⁵⁶, que é considerado o membro predominante^{57,58}. O BDNF é um polipeptídeo não glicosilado com 119-aminoácido⁵⁹ com origem nos chamados tecidos-alvos⁶⁰ chega até a medula espinal por transporte anterógrado a partir dos corpos celulares. As neurotrofinas atuam ligando-se a dois tipos de receptores de membrana plasmática, o receptor de tirosina cinase B (TrkB) e o receptor de neurotrofina p75 (p75NTR)⁶¹.

Além dos efeitos citados anteriormente como crescimento e desenvolvimento neuronal e sinaptogênese, existem potenciais efeitos deletérios do BDNF relacionados ao seu envolvimento na dor inflamatória e neuropática⁶². Por aumentar a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica⁶³, o BDNF também aumenta a

nocicepção. Em alguns casos os mecanismos compensatórios desencadeados pela lesão nervosa podem levar à persistente hipersensibilidade a dor, conhecida como sensibilização central, uma forma de neuroplasticidade mal adaptativa no SNC⁶³.

O BDNF pode levar a dor não só pelo aumento da excitabilidade, mas também pela diminuição da inibição na medula espinal. No SNC ele promove a regulação negativa da expressão do co-transportador de cloreto (KCC2) no corno posterior da medula espinal, o principal transportador de cloreto nos neurônios da lâmina I da medula espinal. Esse fenômeno induz uma inversão do potencial de cloreto dos neurônios de segunda ordem, tornando-os excitados quando estimulados pelo GABA ou glicina o que aumenta a facilitação neuronal⁶⁴.

Também no SNC, ocorre de forma aguda estímulo aos receptores NMDA⁶⁴, enquanto a exposição ao longo prazo ao BDNF aumenta as ações dos receptores AMPA⁶⁵. Ambos os receptores são ativados pelo neurotransmissor glutamato e promovem o aumento do Ca^{2+} intracelular⁶⁶. Ocorre ainda indução de potenciação⁶⁷ a longo prazo e regulação negativa do transportador astrocítico de glutamato (EAAT2)⁶⁸. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e o EAAT2 é responsável por sua remoção da fenda sináptica⁶⁶, de modo que todas essas ações contribuem para hiperexcitabilidade neuronal.

No sistema nervoso periférico a expressão do BDNF é regulada pelo NGF⁶⁹, o qual foi encontrado estar aumentado nos neurônios do GSNE ipsilaterais após lesão por constrição crônica do nervo isquiático⁷⁰. O BDNF e o NGF também estavam aumentados no GSNE em modelos de ligação parcial do nervo espinal e esmagamento do nervo isquiático onde o BDNF se encontrou em maior quantidade no GSNE ipsilateral⁷².

A respeito das ações periféricas do BDNF, foi demonstrado que o BDNF ativa o receptor P75NTR, o que leva a um aumento da excitabilidade neuronal, como resultado da ativação de canais de sódio tetrodotoxina resistentes (TTX-r Na^+) e inibição de canais de potássio retificadores de voltagem⁷³ (KV) nos neurônios do GSNE. Estes canais KV, por sua vez, são determinantes da frequência e da duração dos potenciais de ação. Uma redução na atividade desses canais resulta em aumento da frequência e duração dos picos de despolarização, bem como reduz o limiar de ação, levando à hiperexcitabilidade geral da membrana neuronal⁷⁴.

O BDNF quando ativa o receptor TrkB, reduz a expressão dos canais KV e canais potássio ativado por cálcio de alta condutância (BKCa)⁷⁵. Esta regulação ocorre

através de sinalização nuclear com consequente redução da transcrição celular envolvida com esses receptores. Os canais de BKCa contribuem para a repolarização dos potenciais de ação dão origem a uma rápida pós-hiperpolarização, que afeta o disparo neuronal, reduzindo o tempo do potencial de ação, dependendo das propriedades das correntes de K^+ mediadas pelo BKCa⁷⁶.

Além disso, sabe-se que na dor neuropática vários tipos de canais de sódio são ativados^{77,78,79}, bem como canais de potássio⁷⁷ são inibidos, no entanto, ainda não se comprovou uma relação causal entre estes outros receptores e o BDNF⁸⁰. A ativação dos canais TTX-r Na^+ , bem como de outros canais de sódio nas vias aferentes primárias promove o influxo de sódio nos axônios periféricos, essencial para a geração e propagação dos PAs⁸¹.

1.1.5 Papel do óxido nítrico e suas isoformas na dor neuropática

A falha em tratar efetivamente a dor ainda é devida ao fato de que existe pouca compreensão acerca dos mecanismos subjacentes à sua sinalização e isso torna-se evidente pela alta incidência de efeitos colaterais associados a tratamentos sistêmicos que não visam diretamente o local da dor⁸¹. Mediadores solúveis, liberados em locais de lesão ou doença, provavelmente são fatores chave para a geração, manutenção e modulação da dor⁸³. Um forte candidato a mediador que está implicado na patogênese da dor neuropática é o neurotransmissor NO⁸⁴. O NO apresenta importante papel na modulação da dor, agindo como um neurotransmissor e neuromodulador. Contudo, ele é um neurotransmissor diferente dos outros, pois o NO não é armazenado em vesículas sinápticas e liberado por exocitose⁸⁴.

NO é produzido pela óxido nítrico sintase (NOS) durante a conversão de L-arginina em citrulina, usando fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH), mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina adenina (FAD), calmodulina, heme e a tetraidrobiopterina (BH_4) como cofatores⁸⁴. O cofator BH_4 , por exemplo, é essencial na produção de serotonina, NO, catecolamina e tem ação intrínseca como regulador da sensibilidade dolorosa. Os autores complementam que a enzima para síntese de BH_4 , chamada de GTP ciclo-hidrolase (GCH1) representa uma chave para a modulação da neuropatia periférica e dor inflamatória^{85,86}.

Em relação aos efeitos do NO, os mesmos dependem dos seus níveis de concentração, sendo que em baixas concentrações (10-150nM) o NO tem funções fisiológicas como plasticidade neuronal, neuroproteção, homeostase vascular e vasodilatação⁸⁷. Entretanto, em concentrações altas (300nM) tem comportamento citotóxico nos fenômenos fisiopatológicos como neurotoxicidade e dor patológica⁸⁸.

No que se refere às ações do NO, podem ser diretas e indiretas. As ações diretas são mediadas por ativação de guanilil ciclase solúvel (GC-S) com produção de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) ou pela ativação direta de canais iônicos. Por outro lado, as ações indiretas são mediadas por estresse oxidativo e nitrosativo⁸⁹. Em várias atividades e ações biológicas o NO está envolvido no relaxamento de músculo liso, influência na permeabilidade endotelial, cardioproteção, plasticidade neuronal e melhora das funções cognitivas. Além disto, o NO é capaz de potencializar as sinapses via receptores NMDA os quais medeiam a liberação de amino ácidos excitatórios. Entretanto, o NO gera dano neuronal em condições patológicas e exerce um papel nas doenças neurodegenerativas^{84,90}.

Existem três isoformas de NOS: a neuronal (nNOS ou NOS1), a induzida (iNOS ou NOS2) e a endotelial (eNOS ou NOS3). Estas isoformas tem atividades e localizações (tecidos) distintas. A NOS1 e NOS2 são enzimas citosólicas enquanto a NOS3 está ligada à membrana. Além do mais, NOS3 e NOS1 apresentam suas atividades de maneira dependente de Ca^{++} calmodulina enquanto que a atividade da NOS2 é de maneira independente da Ca^{++} calmodulina⁹¹.

Tabela 1 - Diferenças entre as isoformas óxido nítrico sintases (NOS)

	NOS1	NOS2	NOS3
Natureza	Constitutiva	Induzida	Constitutiva
Localização	Tecido nervoso, esquelético e músculo liso, fibroblastos	Sistema imunológico, queratinócitos, astrócitos, micróglia e fibroblastos	Endotélio, astrócitos, miócitos cardíacos, queratinócitos
Localização subcelular	Mielina (cérebro)	Principalmente	Principalmente
Regulação	Ca^{++} dependente	Ca^{++} independente	Ca^{++} dependente
Funções	Comunicação neuronal, proteção e dor	Defesa imune, inflamação e dor	Vasodilatação e dor

Fonte: Adaptado de Ahlawat et al., 2014⁸⁴.

Tem sido demonstrado que o NO modula a excitabilidade de neurônios periféricos e espinais nociceptivos por meio de múltiplos mecanismos que podem comprometer seus papéis distintivos na dor. A regulação diferencial das NOS, contribui principalmente para a complexidade subjacente ao papel do NO na nocicepção⁹². Durante o processamento da dor, três sítios de modulação são de fundamental importância: no local da lesão ou inflamação - nocicepção periférica, processamento e transmissão espinal e por fim, processamento supra-espinal. Baixas concentrações de NO no local da lesão produzem efeitos antinociceptivos, enquanto que, em concentrações mais altas, o NO tem efeitos pro-nociceptivo¹⁰.

O NO participa do processamento nociceptivo na medula espinal pela ativação da GC-S, que, por sua vez, produz o cGMP. A elevação intracelular dos níveis de GMPc pode ativar ainda mais a proteína cinase G. O NO também produz peroxinitrito reagindo rapidamente com o superóxido, que aumenta a fosforilação de receptores NMDA, sugerindo o papel do NO na sensibilização central^{93,94}. A dor neuropática causada por lesão nervosa está associada ao aumento da liberação de glutamato nos terminais aferentes primários nociceptivos, estimulando os receptores para glutamato na medula espinal, mediando a neurotransmissão excitatória e liberando co-transmissores, como a substância P⁹⁵.

Ademais, neste contexto supracitado, há forte relação descrita nos estudos acerca do estresse oxidativo, NO e a dor neuropática onde é possível exemplificar, neste contexto, a reação de NO com o ânion superóxido resultando em peroxinitrito^{96,97}. Este produto, o peroxinitrito, é uma espécie ativa de nitrogênio altamente reativa causadora de danos celulares⁹⁸. Ademais, afirma-se que a presença de peroxinitrito está associada à nitração de proteínas como a SOD. Sendo assim, a nitração juntamente com a inativação da SOD leva a um aumento do ânion superóxido, que por consequência leva à uma formação adicional de peroxinitrito. O resultado deste processo é um aumento da excitabilidade no CPME com o aumento da transmissão nociceptiva⁹⁹. Sendo assim, por meio de uma ação terapêutica, a sintomatologia clínica da dor neuropática pode ser prevenida ou tratada por meio de inibição da síntese de NO e da remoção do ânion superóxido e consequentemente de peroxinitrito¹⁰⁰.

Além disto, uma das causas fundamentais subjacentes a dor neuropática tem sido a produção aumentada (exacerbada) de NO pela isoforma NOS1¹⁰¹. No entanto, esse aumento na produção de NO parece ser importante para a sobrevivência de neurônios do GSNE após lesão de nervos. Essa afirmação deriva do fato de que foi observado em neurônios do GSNE um aumento no processo de morte celular em camundongos deficientes em NOS1.

Duas vias de sinalização intracelular têm sido descritas como responsáveis pela manutenção da dor persistente, sendo elas: i) NOS1/NO/cGMP/Canais iônicos e ii) NOS1/NO/EROs/NMDA. O NO estimula a glanilil ciclase nos neurônios do GSNE e no CPME para formar o cGMP. O cGMP ativa ainda vários processos intracelulares, incluindo a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) e canais iônicos. Quando ocorre lesão e inflamação no nervo a proteína cinase G é transportada retrogradamente para o GSNE levando à liberação de glutamato e um subsequente aumento na atividade da NOS1¹⁰². Um dos principais eventos responsáveis pela hiperexcitabilidade neuronal induzida pelo NO é o seu efeito sobre canais de cálcio e sódio no GSNE por vias dependentes de GMPc¹⁰³. A sensibilização central produzida por NOS1 / NO também está relacionada com a consequente produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) pelo NO. O NO reage com o ânion superóxido produzido na célula ou pela própria NOS1, aumentando a fosforilação de receptores do tipo NMDA, resultando em sensibilização central¹⁰⁴.

Outro importante evento relacionado a capacidade da NOS1 em promover hiperexcitabilidade neuronal é o fato dela promover a regulação da expressão de mediadores inflamatórios, como por exemplo as quimiocinas. Interessantemente, foi demonstrado que a alodinia tátil e a hiperalgesia térmica observadas após a lesão nervosa estão relacionadas a sensibilização de fibras do tipo C¹⁰⁵ devido a ativação de receptores para quimiocinas nestes neurônios sensoriais^{106,107}.

Outra isoforma que apresenta um importante papel na dor neuropática é a NOS2, que é expressada nas células gliais e está envolvida na produção da hiperalgesia¹⁰⁸. A NOS2 é expressada tanto no astrócitos quanto na micróglia, e a quantidade de NO liberada dessas fontes não neuronais é significativamente maior que a dos neurônios¹⁰⁹. A NOS2 desempenha um papel importante na disfunção e degeneração dos nervos após uma lesão nervosa, por meio da produção de peroxinitrito no nervo periférico. Além de produzir estresse nitrosativo em axônios e células de Schwann¹¹⁰.

A expressão da NOS2 nas células gliais pode ser induzida por muitas citocinas pró-inflamatórias. Algumas citocinas como IL-1 β e IFN- γ , sozinhas, podem induzir NOS2 em células gliais. Outras citocinas (por exemplo, TNF) geralmente induzem NOS2 em conjunto com IL-1 β e IFN- γ ¹⁰⁹.

Outro mecanismo importante na produção de dor neuropática e morte celular mediado pela NOS2 é por meio da liberação de glutamato e sensibilização do receptor NMDA. Por esse mecanismo células micróglias e astrocitárias ativadas expressam NOS2 e conseqüentemente produzem NO que causa a mobilização de cálcio do retículo endoplasmático, promovendo com isso a liberação de glutamato vesicular nos astrócitos. Além disso, o NO inibe a respiração mitocondrial nos neurônios. Essa inibição mitocondrial causa uma despolarização no neurônio, causando liberação de glutamato através do transportador de glutamato e sensibilização do receptor NMDA que resulta em morte neuronal⁸³.

Em um estudo envolvendo a lesão por constrição crônica do nervo esquiático em camundongos, verificou-se que o sistema nitrérgico está envolvido na hiperalgesia térmica. Especificamente, foi observado um aumento do imunoconteúdo das isoformas NOS1 e NOS2 tanto na epiderme da pata, quanto no GSNE¹¹¹.

1.1.5.1 Função do NO na pele

Há décadas se tem evidências da síntese do NO na pele de seres humanos¹¹². Nas camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme), existem células que expressam NOS e que parecem ser capazes de liberar NO. Estas células são os queratinócitos, fibroblastos, melanócitos e células endoteliais¹¹³.

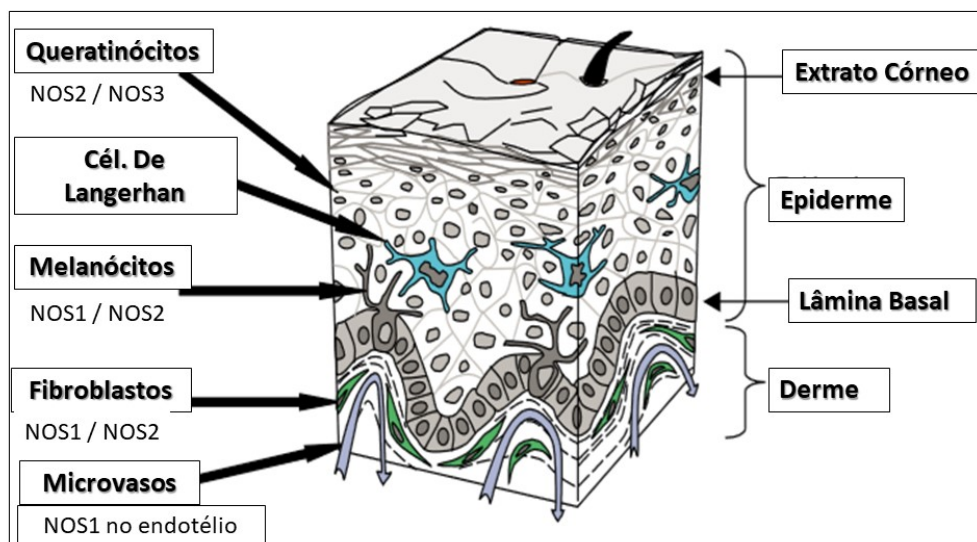


Figura 3 – Diagrama das camadas da pele com os tipos de células e suas respectivas expressões de isoformas NOS.

Legenda: NOS1 – isoforma NOS endotelial; NOS2 – isoforma NOS induzida; NOS3 – isoforma NOS neuronal. Fonte: Adaptado de Cals-Grierson & Ormerod, 2004¹¹³.

Os queratinócitos representam cerca de 90-95% das células na epiderme¹¹³ e muitas evidências mostram que os queratinócitos expressam constitutivamente NOS1 e NOS2 quando expostos a citocinas inflamatórias¹¹⁴. Os fibroblastos expressam NOS2 e NOS3. As células endoteliais também expressam NOS3 e podem expressar NOS2 quando são expostas ao TNF ou de maneira mais exacerbada ao Interferon *gama* (IFN- γ). NOS1, NOS2 e NOS3 também são expressadas pelos melanócitos¹¹³.

O NO na pele e a liberação de NO pelas células endoteliais na microvasculatura exerce um papel fundamental nos ajustes das taxas do fluxo sanguíneo¹¹⁴. Por exemplo, quando a pele é aquecida e a NOS é inibida, observa-se um efeito vasoconstrictor¹¹⁵. A NOS responde rapidamente a sinalização neurogênica e mudanças de temperatura com um aumento na produção de NO que naturalmente produz ação direta sobre a vasculatura, uma vez que a liberação de NO na pele está envolvido no controle do fluxo de sangue dependente de GMPc, promovendo relaxamento da musculatura lisa vascular¹¹³.

1.1.6 O papel do queratinócito na dor neuropática

O tratamento da dor neuropática com foco na modulação periférica, como tem sido utilizado em muitas abordagens nos tratamentos fisioterapêuticos, tais como: a

imersão em água aquecida ou imersão em água termomineral (IATM) tem sido pouco explorado. São vários os argumentos racionais que justificam a utilização do alvo periférico como a pele no tratamento da dor neuropática. Por exemplo: i) a pele é rica em estruturas que se comunicam entre si, contribuindo para a sensibilização periférica, e os queratinócitos são até agora um alvo em potencial, mas negligenciado; ii) a sensibilização periférica é um fator que contribui para a sensibilização central, uma vez que os impulsos contínuos patogênicos da periferia podem consolidar e agravar ainda mais a sensibilização central; iii) alcançando alvos periféricos na epiderme, como os queratinócitos e inibindo cascatas inflamatórias de baixa intensidade periférica diminui a alça de retroalimentação da sensibilização periférica¹¹⁶.

Nos últimos 30 anos pesquisadores identificaram que os queratinócitos não são programados apenas para sintetizar queratina e diferenciar-se terminalmente no extrato córneo protetor, mas também possuem funções biológicas especializadas¹¹⁷. Os queratinócitos estão em contato funcional muito próximo dos nervos sensoriais e a estimulação isolada deles é suficiente para induzir respostas neurofisiológicas relacionadas à nocicepção^{116,118}. Os queratinócitos expressam vários receptores e sintetizam neuropeptídeos, neurotransmissores e autacoides¹¹⁹ e também estão envolvidos em processos inflamatórios localizados. É preciso reconhecer que essas células podem ter um papel fundamental na patogênese da dor neuropática^{120,121}.

Os queratinócitos são as células mais abundantes na pele, no entanto, eles não são as únicas células ou estruturas de interesse em relação à nocicepção e sensibilização periférica na pele. Existe uma interação íntima entre as células não neuronais, como queratinócitos e várias células imunocompetentes dérmicas - as células dendríticas e mastócitos - bem como com as terminações nervosas livres na pele. Cada um desses componentes é capaz de se comunicar com qualquer outro componente, e uma rede de fatores interativos reúne esses protagonistas no processo de nocicepção e sensibilização periférica. Como os nociceptores terminam na periferia, suas terminações nervosas livres estão diretamente em contato com o tecido lesionado; portanto, qualquer célula da epiderme pode servir como um potencial receptor sensorial para a lesão¹²².

A grande proximidade dos queratinócitos com esses aferentes sensoriais foi identificada já em 1995. A interação entre os queratinócitos e as terminações nervosas nociceptivas estão por toda epiderme em vários níveis, à medida que diferentes

subpopulações neuronais terminam em diferentes camadas da epiderme, dando origem a inervações epidérmicas espacialmente segregadas¹²³.

Especificamente, demonstrando uma forte relação do queratinócito no dor neuropática, foi observado que a estimulação apenas do queratinócito foi suficiente para induzir uma forte expressão do marcador de ativação neuronal c-Fos, no CPME e produzir comportamento de dor¹¹⁶. Outros achados que também sustentam essa hipótese mostraram que o aumento da expressão de neurotrofinas no queratinócito levou a alterações neuroquímicas e neurofisiológicas em neurônios sensoriais, e esses fatores derivados da pele também são importantes para o desenvolvimento de neurônios sensoriais durante o desenvolvimento embrionário ou após lesão (regeneração)¹²⁴.

Em modelos animais de lesão inflamatória ou neuropática, verificou-se que o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) está relacionado com a dor, bem como seu respectivo receptor. Além disso, o receptor de proteína modificadora de atividade e receptor componente de proteína, foram expressos pelos queratinócitos. O CGRP promove diversas alterações funcionais nos queratinócitos, incluindo a proliferação e a produção de citocinas. Além disso, observou-se que o aumento do imunomarcador para o CGRP nos queratinócitos não requer uma cascata inflamatória local¹²⁵.

Os queratinócitos, no entanto, também desempenham um importante papel na antinocicepção por produzir e liberar os peptídeos opioides. Essa liberação pode ser mediada tanto pela ativação de receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂)¹²⁶, quanto por receptores para endotelina B (ET-B)¹²⁷, contribuindo assim para redução da dor neuropática.

1.1.7 Fluxo sanguíneo da pele e termorregulação

O estresse térmico pode causar mudanças consideráveis no fluxo sanguíneo da pele e tal forma que se observa um aumento do fluxo sanguíneo da pele de 6 a 8 L/min durante a hipertermia. Esta vasodilatação com o aumento do fluxo sanguíneo da pele (associado à sudorese) são essenciais para a dissipação do calor durante o exercício e à exposição térmica. Neste contexto, em humanos, a termorregulação se dá pela dissipação e geração de calor, onde o controle central da termorregulação é

feito pela região pré-óptica localizada no hipotálamo anterior funcionando como um termorregulador promovendo dissipação de calor quando a temperatura do corpo elevada conservando e gerando calor quando a temperatura está reduzida¹²⁸.

Em paralelo à vasodilatação cutânea, a evaporação do suor promove a diminuição da temperatura da pele resfriando o sangue circulante nos vasos cutâneos antes do retorno deste sangue ao centro. Este fenômeno permanece até que a temperatura interna atinja a estabilidade¹²⁸.

Foi identificado que existe um limiar de temperatura interna que produz vasodilatação e a sudorese. Fatores que podem alterar os limiares e a sensibilidade da vasodilatação cutânea são aclimação ao calor, exercícios físicos, ritmo circadiano e condição dos hormônios reprodutivos em mulheres^{129,130}.

No que diz respeito ao controle neural reflexo do fluxo sanguíneo da pele via nervos simpáticos vasoconstritores e vasodilatadores, a circulação cutânea humana é a única a contar com este controle neural. A pele glabra (palmas das mãos, face plantar dos pés e lábios) é innervada somente por nervos simpáticos vasoconstritores. Já a pele *não glabra* (com pelos) é innervada por nervos simpáticos vasoconstritores e vasodilatadores¹²⁸. Outro fator importante diferenciando os dois tipos de pele é a presença de anastomoses arteriovenosas na pele glabra. Nesta área da pele, a abertura ou fechamento das anastomoses arteriovenosas podem causar mudanças significativas no fluxo sanguíneo da pele. Sugere-se, com base em modelos animais, que há ação de neuropeptídeo Y e/ou trifosfato de adenosina como mediadores da vasoconstrição cutânea¹³¹. Em humanos, o sistema vasoconstritor é tonicamente ativo em situações termoneutras. Este sistema também é responsável por uma diminuição do fluxo sanguíneo da pele quando ocorre uma exposição ao frio e o bloqueio da atividade desse sistema é responsável por 10% a 20% da vasodilatação cutânea durante a hipertermia¹²⁸.

Os aumentos do fluxo sanguíneo da pele são mediados a princípio (80-90%) por ativação dos nervos simpáticos vasodilatadores quando há aumento da temperatura interna, como ocorre durante no exercício ou exposição térmica (quente)¹³².

Estudos prévios apontaram a bradicinina (desencadeia a produção de NO e prostaglandinas) como a substância responsável por ativar a vasodilatação cutânea e parte do processo foi mediado por nervos sudomotores. Entretanto, a relação entre

nervos sudomotores e vasodilatadores bem como das substâncias vasodilatadoras ainda precisa ser elucidado¹²⁸.

Além disso, o mecanismo da atividade de vasodilatação cutânea inclui a participação do NO, uma vez que o mesmo contribui com aproximadamente com 30% da atividade vasodilatadora em resposta ao estresse térmico (quente)¹³³, como demonstrado na figura 4, onde observa-se uma típica resposta de vasodilatação cutânea, de característica bifásica, onde a fase 1 (0 – 10 min) representa um mecanismo nervoso sensorial e a fase 2 (10 – 30 min), de característica dependente de NO.

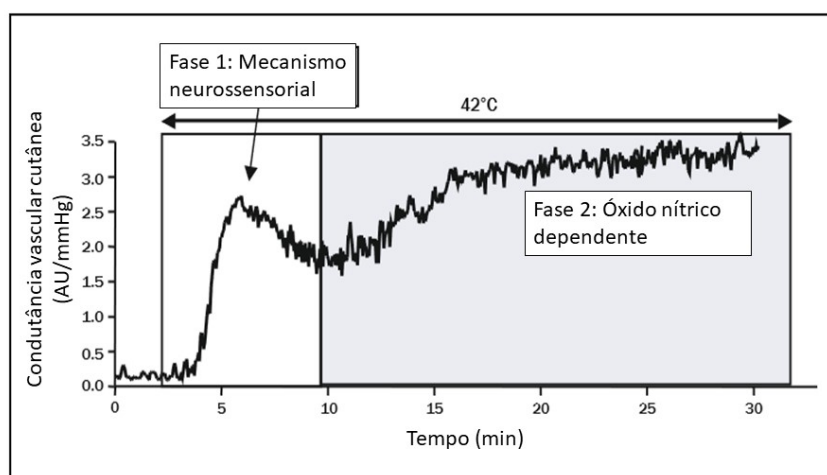


Figura 4 - Vasodilatação cutânea típica durante 30 minutos de aquecimento local.

Fonte: Adaptado de Charkoudian, 2003¹²⁸.

1.1.8 Imersão, termalismo, BT e águas termominerais

Nesta seção, são apresentadas informações acerca das propriedades fisiológicas e terapêuticas da imersão, além de evidências sobre os efeitos da imersão em ATM por meio do termalismo e BT.

Com relação aos efeitos fisiológicos da imersão, estes são resultado daqueles produzidos pela água aquecida junto com os produzidos pelo repouso na imersão e pelo exercício físico, variando com a temperatura da água, intensidade do exercício e duração do tratamento. Na tabela 2, resume-se as principais respostas fisiológicas.

Tabela 2 - Respostas fisiológicas da imersão

Respostas Fisiológicas
Com o aquecimento da pele, os vasos sanguíneos se dilatam aumentando o suprimento sanguíneo periférico. A frequência cardíaca também aumenta com a elevação da temperatura.
A atividade das glândulas sudoríparas e sebáceas é aumentada à medida que a temperatura da pele se eleva.
Débito cardíaco aumenta 34% durante a imersão na água em temperatura termoneutra. Débito cardíaco demonstrou progressivo aumento em temperaturas altas (80% de aumento em 37°C e 121% em 39°C).
Há redução significativa da concentração de hemoglobina, hematócrito, células vermelhas e albumina nos primeiros 30 minutos de imersão retornando ao normal em 2 horas.
Durante a imersão o volume pulmonar incluindo capacidade vital, capacidade pulmonar total, capacidade residual funcional e volume reserva expiratória são diminuídos.
Fonte: Adaptado de Avellini et al., 1983 ¹³⁴ e Robert & Bobo, 1996 ¹³⁵ .

Em relação às ATM, por definição, são soluções naturais formadas sob condições geológicas específicas e caracterizadas por um "dinamismo químico-físico". As tentativas de preparar águas minerais artificiais falharam devido às diferentes atividades biológicas relacionadas a esse dinamismo químico-físico. A água mineral tem três características fundamentais: 1) Origem de uma nascente, 2) bacteriologicamente pura e 3) potencial terapêutico¹³⁶.

Sendo assim, nas seções subsequentes, será apresentado o uso terapêutico das ATM, bem como de sua aplicação, efeitos mecânicos, termais e imunológicos relatados na literatura pesquisada.

Antecipadamente, ainda no que se refere ao uso terapêutico das ATM, observou-se que nos estudos encontrados os termos águas termais, BT, spa terapia, crenoterapia, hidroterapia e termalismo por fim acabam se apresentando como sinônimos apesar de que do ponto de vista epistemológico tem significados próprios e bem delimitados. Com isso, os termos supracitados são recorrentes nos textos e com frequência, referem-se à imersão passiva em ATM de diferentes características, composição e localização geográfica no mundo. Os autores citados nesta seção, produziram seus experimentos em países da Europa e da Ásia, podendo citar Portugal, Espanha, Hungria, Itália e Turquia.

1.1.8.1 Spa terapia

A palavra spa, pode derivar do nome da cidade de Spa na Bélgica, que é conhecida dos tempos romanos como *Aquae Spadanae*, ou talvez tenha outras origens. Alguns autores referem o Spa como o acrônimo de *salus per aquam* (saúde através da água). Já o termo Crenoterapia, um neologismo criado pelo Prof. Ladouzy, (do grego *BKrenos* que significa fonte), que significa tratamento com água mineral¹³⁷.

Muitas águas minerais em spas são ricas em minerais particulares (sílica, enxofre, selênio, rádio) que podem ser absorvidos através da pele. Na terapia de banho de enxofre de Viena-Oberlaa, por exemplo, é oferecida para o tratamento de diferentes formas de distúrbios reumáticos¹³⁸.

1.1.8.2 BT

A BT ou o banho em águas térmicas ou minerais é utilizado como tratamento não invasivo para várias doenças reumáticas¹³⁹ e tem uma longa tradição como terapia para pacientes que sofrem de diferentes transtornos reumáticos sendo oferecida em resorts e spas em todo o mundo¹³⁸.

BT é uma das intervenções não-farmacológicas mais comumente utilizadas para a AO, mas seu mecanismo de ação para aliviar a dor, a rigidez e a melhora da função física não são bem compreendidas. Estudos apontam que a terapia provoca uma série de reações neuroendócrinas com efeitos anti-inflamatórios e analgésicos¹³⁸.

Há indicação clínica e terapêutica para pacientes com doenças musculoesqueléticas, já que o banho nas ATM mostrou proporcionar uma série de benefícios, incluindo a redução da dor¹⁴⁰. Contudo, os estudos clínicos sobre o efeito benéfico deste tipo de terapia ainda carecem de uma caracterização metodológica e qualidade científica¹³⁸. Um exemplo disto, é que não há consenso sobre o uso de crenoterapia em doenças inflamatórias reumáticas, como é o caso da artrite reumatóide¹³⁷. Sendo assim, os mecanismos pelos quais a terapia de imersão em águas quentes reduz a inflamação a dor não estão esclarecidos¹⁴¹.

Uma revisão sistemática que avaliou a eficácia da BT no alívio da dor mostrou resultados não conclusivos em relação à melhora significativa na redução da dor entre pacientes com artrite reumatoide¹⁴².

Além disso, muitos estudos concluíram que mais estudos randomizados e controlados são necessários para obter evidências mais fortes¹⁴⁰ apontando uma grande lacuna na literatura atual sobre as influências das propriedades químicas das ATM para alívio da dor¹⁴³.

O uso clínico da imersão em água, como parte do tratamento de dor crônica, requer um conhecimento detalhado do mecanismo endógeno periférico adjacente aos efeitos antialodínico. Esta modalidade terapêutica é amplamente utilizada na intervenção fisioterapêutica e pode aliviar a dor, provavelmente, ativando várias modalidades somatossensoriais, incluindo tátil, pressão e sensações térmicas¹⁴⁴.

A hipertermia como um meio balneológico tem de fato um efeito protetor sobre as células, mas o enxofre, que inicialmente foi considerado como um meio anti-inflamatório, teve realmente um efeito oposto e induziu a expressão de genes pró-inflamatórios. Os dados confirmaram que o efeito da hipertermia como tratamento médio balneológico é benéfico, e o tratamento com enxofre deve ser tomado em reconsideração¹⁴⁵.

No estudo sobre aquecimento corporal, dor e qualidade do sono em pacientes com fibromialgia, realizado no Centro de Estudos de Psicobiologia e Exercício (CEPE) da USP, os sujeitos investigados receberam intervenções passivas de aquecimento corporal que duraram 30 minutos por intervenção por cinco vezes por semana durante três semanas, entre às 18h e as 20h da noite. Eram supervisionados por um pesquisador durante os banhos terapêuticos (*Barritz Hydrothapy Appliance*, Alemanha) devidamente posicionados em supino com apoio cervical flutuante, com a temperatura da água e do ambiente controlados, 36 °C e 23 °C respectivamente¹⁴⁶.

Os autores apontaram que as temperaturas centrais do corpo dos pacientes permaneceram dentro dos níveis fisiológicos estabelecidos na literatura, que o aquecimento do corpo passivo parece atuar através de respostas periféricas, promovendo o relaxamento muscular, reduzindo a dor e melhorando o padrão de sono dos pacientes FM sem alterar a temperatura central, sugerindo que a intervenção não prejudicou esse mecanismo termorregulador¹⁴⁶.

Na investigação feita com trinta e cinco pacientes, os mesmos foram expostos ao tratamento com BT à temperatura da piscina aquecida de 38 °C e a duração dos banhos de 20 min. Logo após a imersão, os pacientes recebiam aplicações de argila a 45 °C por 20 min. A mineralização total da lama foi de 3406 mg/L. As aplicações foram realizadas por 2 semanas em dias úteis. Além disto, outro grupo de pacientes

(grupo controle = 35) continuaram frequentando um programa de tratamento previamente prescrito para suas queixas de dor devido a fibromialgia. O mesmo pesquisador que foi cegado para o tratamento, também avaliou quatro vezes os pacientes incluídos no estudo: antes do tratamento, imediatamente após o tratamento, e no final do período, e 3 meses depois do tratamento. A partir dos outros estudos balneológicos sobre fibromialgia, o presente estudo foi realizado em ambiente clínico, ao invés de um spa. Portanto, os pacientes não tiveram que mudar suas rotinas de vida diária. Ambos os grupos de pacientes incluídos no estudo tiveram programas semelhantes de educação e de exercícios domiciliares onde foi observado melhorias no grupo controle e que a BT associada à aplicação de lama aquecida é eficaz para o tratamento de pacientes com fibromialgia¹⁴⁷.

A aplicação de um programa de BT com duração de tratamento de 12 dias, e as sessões de spa foram conduzidas em dois grupos (manhã e tarde)¹⁴¹. Os tratamentos incluíram um banho termal quente (36-38 °C) durante 15 a 20 minutos. Uma importante limitação deste estudo foi que não houve acompanhamento com os participantes após os 12 dias. Os autores concluíram que 12 dias tem um efeito positivo na dor, humor, qualidade do sono e depressão em pessoas idosas. Os dados obtidos também informaram sobre as influências do sexo nessas melhorias.

No estudo com pacientes com OA foram de forma randômica e cega alocados em três grupos, sendo um grupo exposto à água sulfúrica, grupo não sulfurada e grupo controle¹³⁹. Os grupos de tratamento receberam 30 banhos termais individuais (três banhos de 20 minutos por semana durante 10 semanas) a 37-39 °C. Ambos os métodos terapêuticos foram eficazes no tratamento da artrose do joelho. No entanto, os banhos sulfurosos produziram efeitos mais duradouros do que os banhos de água não sulfurosos. No que diz respeito ao processo de recuperação funcional o impacto é de que os banhos em águas termais, especialmente aqueles em águas sulfurosas, são eficazes na redução da dor e na melhoria da função física em pacientes com OA do joelho.

Em estudo sobre os efeitos da BT foram avaliados em pacientes com OA do quadril¹⁴⁶. Este estudo randomizado, controlado, cego em pacientes ambulatoriais com OA do quadril de acordo com os critérios ACR. Além da terapia de exercícios domiciliar, um grupo de pacientes recebeu BT por 3 semanas em 15 ocasiões. A água mineral utilizada neste estudo é uma das águas minerais com maior teor de íons sulfídicos (13,2 mg / L) na Hungria. A temperatura da água foi de 36 °C por 20 minutos

de imersão em 15 sessões. O grupo de controle recebeu terapia de exercício sozinho. A diferença entre os dois grupos foi significativa após 12 semanas. Os resultados sugerem que a combinação entre BT e terapia de exercícios físicos melhora mais a qualidade da função das articulações e diminui a dor do que a terapia com exercício somente.

Os mesmos autores citam que o mecanismo exato de ação da BT não é totalmente compreendido. Durante o banho, o enxofre entra no corpo através da pele e do trato respiratório. A água medicinal usada em nosso estudo possui um excelente teor de íons sulfureto (S^{2-}). Nas águas de enxofre, o enxofre está presente em formas múltiplas e variáveis. O composto dominante é sulfeto de hidrogênio (H_2S). Parece que os compostos de enxofre afetam o corpo através de múltiplas vias. Esses compostos influenciam a cascata inflamatória, afetam o sistema imunológico e proporcionam proteção contra danos oxidativos, e seus efeitos analgésicos e de melhoria de função também são observados na prática clínica¹⁴⁷.

Identificou-se em outro estudo que BT (20 minutos/15 sessões) em combinação com fisioterapia é superior à fisioterapia sozinha na redução da dor e da incapacidade e na melhoria da qualidade de vida. Conforme os autores, a BT pode ser um tratamento eficaz no tratamento da dor crônica cervical. Complementando, cita-se que ambos os tratamentos são eficazes, com melhor resultado para a combinação das duas terapias com melhorias que duraram até 3 semanas pós-tratamento¹⁴⁸.

Recentemente¹⁴⁹, publicou-se o estudo com o propósito de determinar o uso e a eficácia da terapia de *spa* em pacientes com doenças reumáticas e musculoesqueléticas em condições de prática clínica cotidianas. A terapia de *spa* compreendeu a BT duas sessões todos os dias, uma da manhã e de tarde. Outras intervenções, incluindo banho turco (*hamam*), massagem, fangoterapia, modalidades de fisioterapia e exercício aquático / terrestre são prescritas de acordo com as necessidades do paciente e de acordo com a disponibilidade do resort de *spa*. Neste sentido observaram que houve diminuição estatisticamente significativa nos escores de dor após terapia de *spa*. Apontaram ainda que na prática diária, a terapia de *spa* é prescrita e utilizada principalmente por portadores de OA, fibromialgia, hérnia de disco lombar / cervical e dor lombar inespecífica bem como espondilite anquilosante, artrite reumatóide e tendinite do manguito rotador, com a sugestão de que a terapia de *spa*

da vida real pode ser eficaz em uma variedade de doenças reumáticas e musculoesqueléticas, melhorando a dor e a função.

É concebível que a BT a partir de águas com mais presença de sal (salina) pode ter propriedades antioxidantes em pacientes com artrite reumatoide (AR), e que isso seria associado a melhores resultados clínicos. No entanto, nenhum estudo *in vivo* ou *in vitro* já investigou os efeitos da BT salina em pacientes com AR¹⁴⁹.

Na intenção de confirmar que os ensaios clínicos existentes sobre BT, uma revisão sistemática verificou há uma associação entre esta terapia e a redução na dor e rigidez e melhora na função em pacientes com OA no joelho. É possível que a BT possa melhorar a capacidade funcional em indivíduos com OA de joelho, embora este achado seja limitado pela baixa qualidade das publicações atuais, o que contribui para a heterogeneidade observada nesta meta-análise¹⁴⁰. Contudo, os autores recomendaram que os estudos futuros identifiquem e avaliem os indicadores fisiológicos objetivos e os biomarcadores, como as citocinas inflamatórias, para investigar ainda mais a eficácia da BT.

Corroborando com a citação acima, a BT tem uma longa história e aqui há um longo caminho para encontrar consenso, especialmente entre os profissionais e o sistema político de saúde. Uma vez que existe um consenso e boa vontade do governo, é possível estudar e aprender mais sobre este assunto¹³⁷.

Finalmente, com base no que fora descrito, ressalta-se a necessidade de se aprofundar e esclarecer os mecanismos envolvidos no tratamento da dor neuropática a partir de terapias não farmacológicas como a BT, que conforme a literatura pesquisada apresenta-se como uma opção de terapia complementar com potencial terapêutico e segura, apesar de que, ainda, mesmo considerando os benefícios relatados e observados, muitos dos efeitos moleculares são pouco conhecidos ou claramente definidos no que diz respeito aos uso destas ATM no tratamento da dor neuropática.

Neste sentido, pode-se concluir, considerando os aspectos etiológicos traumáticos e isquêmicos envolvidos nas neuropatias periféricas, que o sistema nitrérgico participa na manutenção do tônus vascular, bem como na modulação da dor neuropática. Embora altas concentrações de NO no local da lesão causem nocicepção, baixas concentrações têm efeitos antinociceptivos¹⁰.

Por fim, intervenções terapêuticas que aumentam o suprimento sanguíneo local e sistêmico são abordagens interessantes em condições neuropáticas

compressivas / isquêmicas como as terapias não farmacológicas (adjuvantes) no manejo da dor lombar, incluindo a BT¹⁵⁰, que os indivíduos utilizam de banhos (em banheiras ou piscinas) de 20 a 30 minutos em temperatura termo-mineral e / ou mineral de água a 20 ° C ou mais alta de fontes naturais ou poços perfurados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da IATM na hiperalgesia induzida pela LPNI em camundongos e analisar o envolvimento do BDNF, TrkB e do sistema nitrérgico neste efeito.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em camundongos submetidos a LPNI e tratados com imersão em ATM:

- Encontrar o melhor tempo de imersão na redução da hiperalgesia mecânica;
- Determinar o melhor tempo de imersão que aumenta a força de agarrar;
- Avaliar o peso corporal;
- Identificar as alterações no imunoconteúdo de BDNF e TrkB na periferia e sistema nervoso central;
- Verificar as alterações no imunoconteúdo das isoformas das enzimas NOS1 e NOS2 na periferia e sistema nervoso central;

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo não clínico, experimental e analítico.

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

O material e os equipamentos utilizados estão listados a seguir, com seus respectivos fabricantes e locais de origem. Monofilamento von Frey (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA), dinamômetro GripForce (INSIGHT, Ribeirão Preto, SP, Brasil), balança eletrônica de precisão milesimal (BEL Engineering® SP, Brasil), balança digital (KANGRUI, China); Cetamina (Vetnil, São Paulo, Brasil). Xilazina (Ceva, São Paulo, Brasil). Isoflurano (Isoforine®, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Balança de alta precisão (Shimadzu Corporation, Japão). Para o Western Blotting foi utilizado: tampão de lise RIPA, ortovanadato de sódio, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), coquetel de inibidores de proteases e tampão Laemmli (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), membrana de PVDF (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), anticorpos monoclonais anti-BDNF de camundongo (ab205067) e anti-TrkB de coelho (ab187041) (Abcam, Cambridge, MA, EUA). Anti-iNOS de coelho (NOS-2) (NBP1-33780, Novus Biologicals, Centennial, CO, EUA), anti-nNOS de cabra (NOS-1) (SAB2500702 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e anti- β -actina-HRP (A3854) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Solução de Ponceau S (Ponceau S solution, P7170, Sigma-Aldrich, MO, EUA), kit de quimiluminescência (ECL; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA), fotodocumentador (iBright Imaging Systems, iBright Analysis Software, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e software de análise das imagens Image Studio Lite (LI-COR Biosciences, EUA). Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3.3 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 17.039.2.07.IV e 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 conscientes¹⁵¹. Os experimentos foram conduzidos com camundongos suíços machos adultos (25-35 g de peso corporal) obtidos do Biotério da Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, alojados em $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob um ciclo luz-escuro de 12h (luzes acesas às 6h), com acesso a alimentos e água *ad libitum*. Os animais foram aclimatados ao laboratório durante pelo menos 1h antes dos testes e foram avaliados e tratados ao longo dos experimentos. Os experimentos foram realizados entre as 8h e as 11h.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo foi composto por 4 etapas. Na primeira etapa foram realizados experimentos para determinar o efeito da cirurgia de LPNI e da gabapentina (controle positivo) sobre a frequência de resposta de retirada da pata frente a estimulação mecânica nos camundongos, caracterizando assim a hiperalgesia gerada pelo procedimento cirúrgico e seus controles. Nessa etapa foram utilizados os grupos e os respectivos procedimentos descrito no quadro 1.

Quadro 1: Determinação dos grupos para o experimento da etapa 1.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
Grupo 1	$n = 8$	Sham	Veículo (10 ml/i.g.)
Grupo 2	$n = 8$	LPNI	Veículo (10 ml/i.g.)
Grupo 3	$n = 8$	LPNI	Gabapentina (10 mg/i.g.)

Legenda: LPNI – ligadura parcial do nervo isquiático. Total de 24 animais.

Na segunda etapa foram realizados experimentos para determinar a influência da água (pressão mecânica) da torneira (sem minerais) aquecida (temperatura de 35°C) sobre a frequência de resposta de retirada da pata frente a estimulação

mecânica da pata de camundongos com a LPNI. Nessa etapa foram utilizados os grupos e os respectivos procedimentos descrito no quadro 2.

Quadro 2 - Determinação dos grupos para o experimento da etapa 2.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
Grupo 1	$n = 8$	LPNI	Controle*
Grupo 2	$n = 8$	LPNI	IATor 10min
Grupo 3	$n = 8$	LPNI	IATor 20min
Grupo 4	$n = 8$	LPNI	IATor 30min

Legenda: * = O grupo 1 (Controle) recebeu IATor com temperatura ambiente sem aquecimento por 30min. LPNI: ligadura parcial do nervo isquiático; IATor: imersão em água da torneira. Total de 32 animais.

Na terceira etapa foram realizados experimentos para determinar a influência da (IATM) sobre a frequência de resposta de retirada da pata frente a estimulação mecânica, força de agarrar da pata e peso corporal dos camundongos com a LPNI. Nesta etapa foram utilizados os grupos e os respectivos procedimentos descrito no quadro 3.

Quadro 3 - Determinação dos grupos para o experimento da etapa 3.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
Grupo 1	$n = 8$	LPNI	IATor 30min
Grupo 2	$n = 8$	LPNI	IATM 10min
Grupo 3	$n = 8$	LPNI	IATM 20min
Grupo 4	$n = 8$	LPNI	IATM 30min

Legenda: IATor: imersão em água da torneira; IATM: imersão em água termo mineral. LPNI: ligadura parcial do nervo isquiático. Total de 32 animais.

E na quarta etapa foram realizados experimentos para verificar as alterações no imunoconteúdo do BDNF, TrkB e das isoformas NOS1 e NOS2 da NOS. Nesta etapa foram utilizados os grupos e os respectivos procedimentos descrito no quadro 4.

Quadro 4 - Determinação dos grupos para o experimento da etapa 4.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
Grupo 1	$n = 8$	Sham	-
Grupo 2	$n = 8$	LPNI	-
Grupo 3	$n = 8$	Sham	*Controle
Grupo 4	$n = 8$	Sham	IATM 30min
Grupo 5	$n = 8$	LPNI	*Controle
Grupo 6	$n = 8$	LPNI	IATM 30min

Legenda: * = O grupo 3 (Controle) recebeu IATor com temperatura ambiente sem aquecimento por 30min; IATor: imersão em água da torneira; IATM: imersão em água termo mineral; LPNI: ligadura parcial do nervo isquiático. Total de $32 \times 2 = 64$ animais.

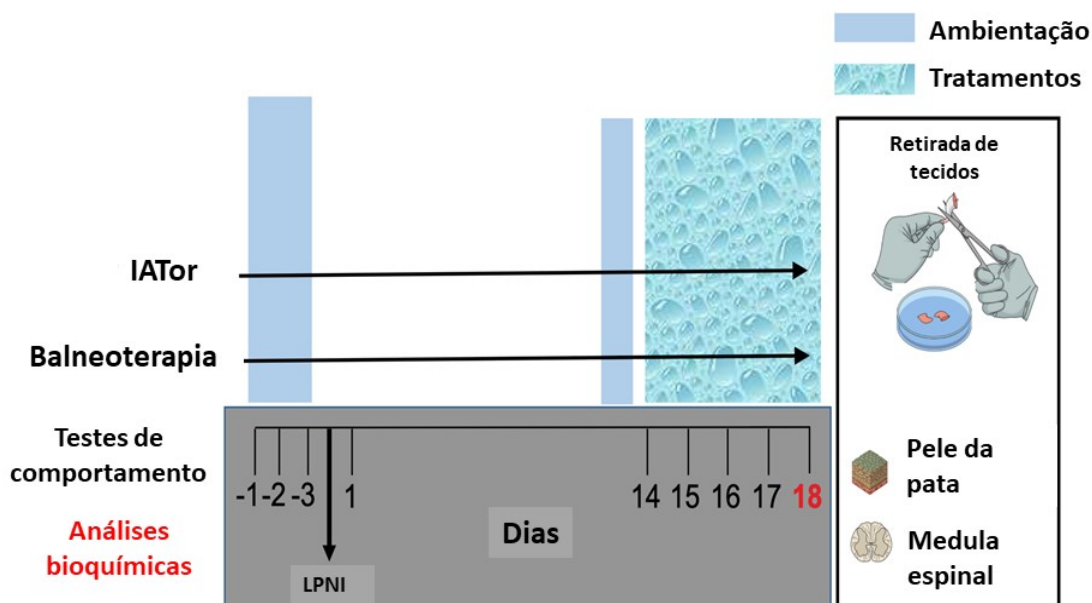


Figura 5 – Ilustração do delineamento do estudo.

3.5 TESTES

3.5.1 Indução da neuropatia por meio da LPNI

Para a cirurgia, os animais foram anestesiados com injeções intraperitoneais contendo xilazina (10 mg / kg) e cetamina (80 mg / kg). Depois disso, os animais foram tricotomizados na área a ser operada, assim como, foi realizada a assepsia com 10% de povidona iodo (Povidina®). Logo após, os animais foram devidamente posicionados, de forma segura, para início do procedimento cirúrgico, sob anestesia por inalação (Isoflurano). Então, foi feita uma incisão curvilínea na coxa direita, começando acima e medial ao trocânter maior do fêmur e terminando perto da fossa poplíteia. O nervo isquiático foi exposto após a divulsão dos músculos reto femoral e semitendíneo. Em seguida 1/2 ou 1/3 do nervo isquiático foi amarrado com fio 7.0 de prolipropileno (adaptado de¹⁵²) aproximadamente 5 mm acima da trifurcação nervosa. Para o grupo sham, os animais tiveram o nervo isquiático exposto, mas não foram submetidos a lesão. Imediatamente após, o músculo e a pele foram suturados com suturas absorvíveis (catgut, 5-0) e esterilizadas com anti-séptico (Povidina®). Após a cirurgia, os animais permaneceram em uma cama aquecida para evitar hipotermia próximos a uma lâmpada acesa como fonte de calor até retornarem a deambular pela caixa, retornando então ao biotério de manutenção do laboratório.

3.5.2 Tratamento com imersão em ATM

O tratamento com imersão em ATM, foi feito em ambiente experimental e controlado no LaNEx. Para isso, ATM foi coletada por garrafas térmicas diretamente na fonte localizada dentro do Hotel Caldas da Imperatriz - SC (Latitude 27°43'49.9" e Longitude 48°48'37.4"), sendo imediatamente realizado o traslado do volume coletado até o LaNEx da Unisul, Unidade Pedra Branca. Na fonte a água apresenta temperatura de 41°C e após ser engarrafada e transportada ao LaNEx ela permanecia torno de 35°C.

Para realizar o tratamento dos animais com imersão em ATM eles foram alocados em uma caixa plástica com capacidade para 35 litros de água, dividida com acrílico, em oito compartimentos sendo isolada externamente com placas de isopor para manter a temperatura da água. Foi colocada quantidade suficiente (aproximadamente 6 litros) para manter parcialmente imerso o corpo dos animais, conforme a figura 6. Este mesmo procedimento relatado acima, foi executado nas fases do estudo onde se utilizou água da torneira¹⁵³.

A ambientação dos animais foi feita de tal modo em que todos os animais que receberam tratamento com IATM foram previamente ambientados por meio da imersão em água com temperatura termoneutra (30°C) por 10 minutos durante três dias consecutivos.

A temperatura da água foi mantida a 35°C monitorada por um termômetro de laboratório, para que mantivesse a 35°C. Em caso de possível queda da temperatura, nova preparação do ambiente era realizada para garantir a exposição dos animais à temperatura proposta nos experimentos. A imersão foi controlada também quanto à profundidade e atitude do animal para que permaneça em repouso. Após cada exposição à imersão, os animais foram suavemente secos por meio de contato direto à tecido absorvente e maravalha seca em uma caixa limpa. Após alguns minutos, os camundongos foram aclimatados para a sequência dos experimentos comportamentais. Ao final dos procedimentos, os animais retornaram ao biotério, devidamente seguros e acomodados em suas caixas moradia com livre acesso à comida e água em ambiente controlado.

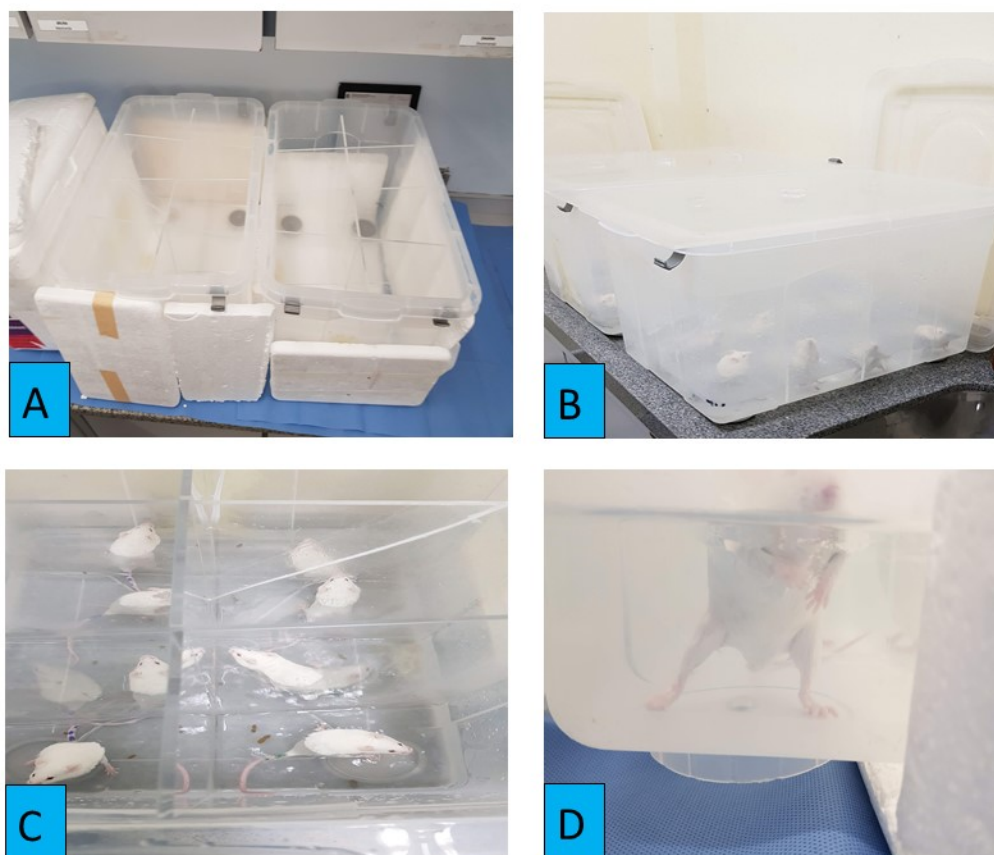


Figura 6 - Ambiente e imersão dos animais.

Legenda: Em A, organização das caixas para imersão e isolamento com isopor. Em B, grupos de animais em imersão, com destaque ao isolamento superior com tampas de acrílico. Em C, vista de um dos animais no posicionamento padronizado e adequado para imersão. Em D, vista superior do grupo de animais e a separação para imersão.

3.5.3 Tratamento com gabapentina

Como controle positivo, um grupo de animais foi tratado por via intra-gástrica com gabapentina (10 mg/kg). Após a administração de gabapentina (Figura 7), os animais seguiram a mesma rotina de imersão e avaliações.

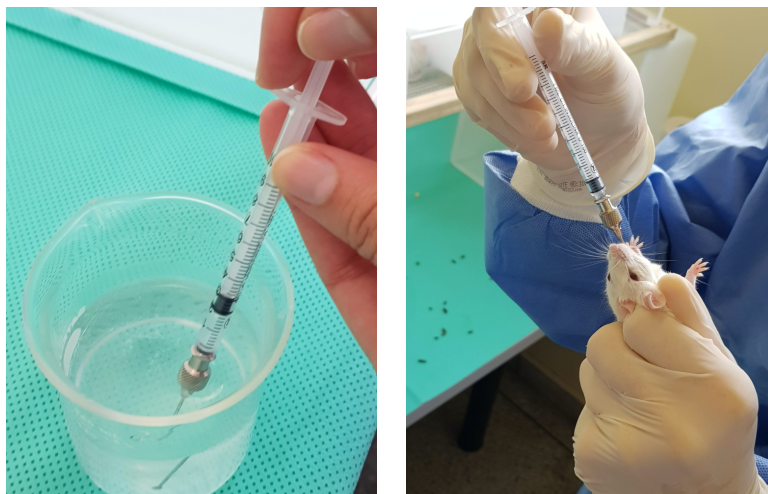


Figura 7 – Administração intra-gastrica de gabapentina, utilizada como controle positivo.

3.5.4 Avaliação da hiperalgesia mecânica

Para avaliação da hiperalgesia mecânica os animais foram aclimatados em caixas de acrílico individuais (9 x 7 x 11 cm) em uma plataforma de malha de arame elevada para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. Foi realizado um procedimento de ambientação ao ambiente de avaliação e ao filamento por 3 dias consecutivos onde os animais foram submetidos a estimulação plantar com o filamento de von Frey de 0,04g antes do procedimento cirúrgico, conforme a figura 8. Após a cirurgia os animais foram avaliados nos dias 3, 7, 10, 14 e 18 utilizando o filamento de von Frey de 0,6g. A frequência de resposta de retirada da pata direita à 10 aplicações do filamento de vF de 0,6g foi registrada como o indicativo de hiperalgesia mecânica (% de resposta)¹⁵⁴.

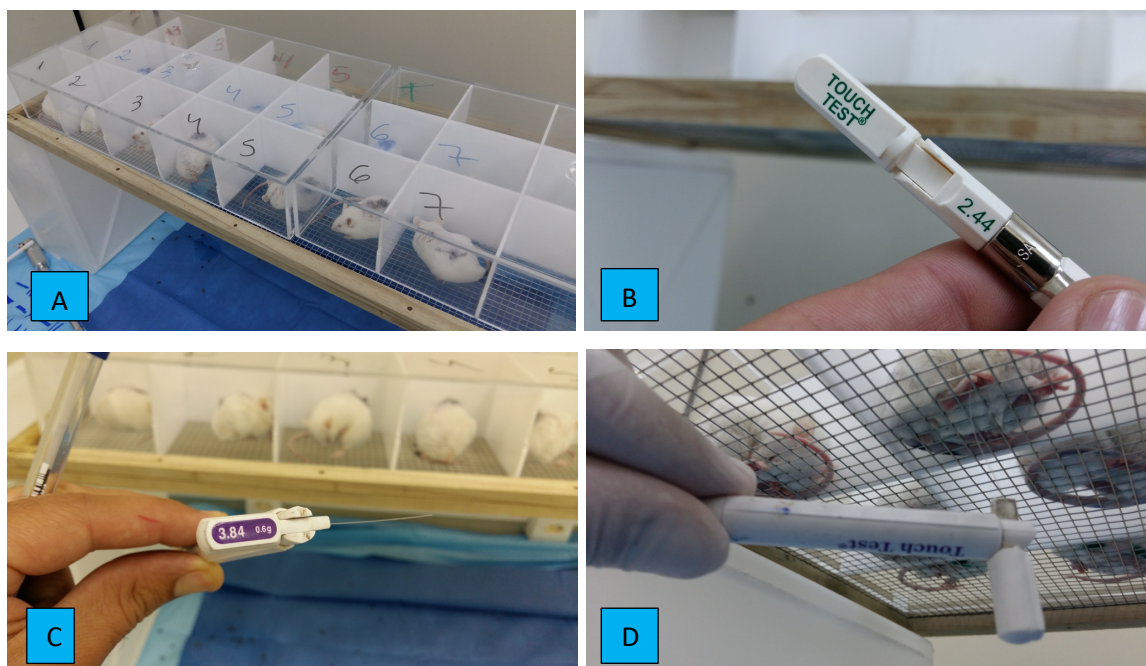


Figura 8 - Ilustrações referentes à ambientação e uso dos filamentos von Frey .

Legenda: Em A, organização e posicionamentos dos animais. Em B e C, ilustração dos monofilamentos de von Frey e em D, realização do teste para avaliação da hiperalgesia mecânica com o monofilamento de von Frey de 0,6g.

3.5.5 Avaliação da força muscular

Para avaliar a recuperação funcional dos animais, também foi utilizado a mensuração da força de preensão plantar. A força foi medida por meio de um dinamômetro digital e foi realizada conforme descrito previamente por Kehl e colaboradores (2000)¹⁵⁵ com pequenas modificações. Os animais foram contidos gentilmente e induzidos a agarrarem com apenas uma das patas posteriores a grade metálica do aparelho. Em seguida, o experimentador moveu o animal lentamente no sentido rostrocaudal até o animal soltar a grade, conforme a figura 9. Três medidas de cada pata posterior foram registradas em gramas (g) e a média foi calculada. As coletas de força de preensão, bem como de peso corporal, foram registradas antes da LPNI (basal) e durante as cinco semanas seguintes. O cálculo de força relativa do membro experimental e controle em relação ao peso do animal $[Força(g) / Peso (g)]$ foi utilizado para tabulação e análise estatística. As avaliações aconteceram um dia antes da cirurgia e nos dias 3, 7, 10, 14 e 18 pós cirurgia.



Figura 9- Equipamento *grip force*.

Legenda: Em A, equipamento e aproximação do animal para a medida e em B, movimento de preensão da pata direita para registro da força.

3.5.6 Western blotting de BDNF, TrkB, NOS1 e NOS2 na pata e medula espinal

Para realização desta etapa do estudo, os animais foram previamente eutanasiados (conforme item 3.6). Com isto, as estruturas foram coletadas para preparação das amostras, os tecidos congelados foram pulverizados em nitrogênio líquido e 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 30min.

Os homogenatos foram centrifugados a 6000 rpm por 20min a 4°C, o sobrenadante (correspondente ao extrato total) foi coletado, sendo uma alíquota 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 Laemmli (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%) na proporção de 1:6. As amostras foram fervidas (95°C; 5 min) e permaneceram armazenadas a -80°C até o momento da eletroforese.

Para separação de proteínas e imunodeteção, todas as amostras foram mantidas em gelo até o completo descongelamento. Após, 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 1h e 30min. Em seguida, as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau

0,2%, ácido tricloroacético 3%) para visualização das proteínas. Após lavagens em TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 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 1h a temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas. Na sequência, as membranas foram 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: camundongo anti-BDNF (1:1000), coelho anti-TrkB (1:5000), coelho anti-NOS2 (1:1000), cabra anti-NOS1 (1:1000) e β -actina-HRP (1:45000). Ao término do período de incubação, as membranas foram lavadas durante 30min com TBS-T, e em seguida, incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados a peroxidase (1:5000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) (exceto para anti- β -actina-HRP) por 1h em temperatura ambiente.

Após esse período, uma nova lavagem de 30min com TBS-T foi realizada seguida pela exposição das membranas durante 1 minuto ao kit de quimiluminescência e revelação através de um fotodocumentador. As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa Image Studio Lite. Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a β -actina, e expressos graficamente como unidades arbitrárias^{156,157}.

3.6 MORTE INDOLOR ASSISTIDA (MIA)

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

3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 7 - Variáveis de estudo

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de Utilização
Modelo de LPNI	Independente	Qualitativa dicotômica	Lesionado ou Sham
Hiperalgesia mecânica	Dependente	Quantitativa contínua	Frequência de retirada (%), Média $\pm$ Desvio padrão
Força de agarrar	Dependente	Quantitativa contínua	Gramas Média $\pm$ Desvio padrão
Peso corporal	Dependente	Quantitativa contínua	Gramas Média $\pm$ Desvio padrão
Tempo de IATM	Independente	Quantitativa contínua	Minutos (10, 20 ou 30)
Tempo de imersão em água da torneira	Independente	Quantitativa contínua	Minutos (10, 20 ou 30)
Gabapentina	Independente	Qualitativa dicotômica	Grupo controle positivo (gabapentina) ou veículo
Imunoconteúdo de NOS1 e NOS2	Dependente	Quantitativa contínua	Unidade arbitrárias. Média $\pm$ Desvio padrão
Imunoconteúdo de BDNF e TrkB	Dependente	Quantitativa contínua	Unidade arbitrárias. Média $\pm$ Desvio padrão

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados no programa *Graph Pad Prism* na versão 8.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Foi avaliada a normalidade de distribuição dos dados por meio do teste de *Shapiro – Wilk*. Desta forma, os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os dados paramétricos foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de *Student Newman Keuls* ou *Bonferroni*. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

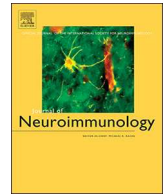
3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Antes que ocorressem qualquer execução das etapas deste projeto, o mesmo foi submetido e aprovado pela CEUA da UNISUL sob o número 17.039.2.07.IV.

Os possíveis sinais de sofrimento dos animais foram avaliados como apatia, letargia, infecção sistêmica, perda de peso, desidratação. No entanto, nenhum animal apresentou esses sinais e nenhum animal foi retirado do estudo.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Essa sessão será apresentada no formato do artigo científico que foi aceito pela revista *Journal of Neuroimmunology*, Elsevier®.



Balneotherapy decreases mechanical hyperalgesia by reversing BDNF and NOS2 immunocontent in spinal cord of mice with neuropathic pain

Rômulo Nolasco de Brito^{a,b}, Daniela D. Ludtke^{a,b}, Bruna Hoffmann de Oliveira^{a,b},
Taynah de Oliveira Galassi^{a,b}, Paula Franson Fernandes^{a,b}, Sarah Van Den Berge^a,
Afonso Shiguemi Inoue Salgado^{a,b,c}, Francisco José Cidral-Filho^{a,b}, Verônica Vargas Horewicz^{a,b},
Franciane Bobinski^{a,b}, Daniel Fernandes Martins^{a,b,*}

^a Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil

^b Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil

^c Integrative Physical therapy Residency, Centro Universitário Filadélfia, Londrina, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Balneotherapy
Chronic pain
Immersion therapy
Thermalism
Sciatic nerve injury

ABSTRACT

In the last decades, balneotherapy or thermalism has been used for health promotion and in the treatment of inflammatory and chronic processes. We found that balneotherapy reduced mechanical hyperalgesia, as well the increase of BDNF and NOS2 levels in the spinal cord, while increased BDNF and NOS1 in the paw. The data presented herein demonstrated for the first time in a murine model of neuropathic pain, the analgesic effect of balneotherapy with the water from the natural springs of Santo Amaro da Imperatriz-Brazil. Nevertheless, future clinical trials should be conducted to test the effectiveness of balneotherapy in neuropathic pain patients.

1. Introduction

Low back pain (LBP) is a common public health problem worldwide (Bai et al., 2019). For quite a number of patients affected by the development of chronic back pain, the disease is extremely disabling. Chronic pain is comprised of nociceptive and neuropathic components. In chronic back pain the neuropathic component may involve mechanical compression of radicular nervous tissue within or adjacent to inter-vertebral foramina, within the lateral recess and/or within the spinal canal itself. Hence, a variety of nerve-damaging stimuli are likely to generate a neuropathic pain component in patients with chronic LBP (Teixeira et al., 2016). Significantly, many long-term LBP patients report neurological deficits and/or somatosensory positive symptoms that can be described as characteristic of a neuropathic pain component, i.e. hyperalgesia and allodynia (Teixeira et al., 2016).

Neuropathic pain treatment is based on a combination of different classes of drugs, such as analgesics, antidepressants, anticonvulsants, or other adjuvants. The drugs of choice are tricyclic antidepressants (Dworkin et al., 2003). When there is no response to treatment, traditional antiepileptics, such as gabapentin and morphine, are commonly be associated. However, a high number of patients abandon treatment due to side effects. In this sense, the discovery of more effective treatments with few or no side effects is important.

Despite the high prevalence of neuropathic pain, it is often inadequately treated due to its complex pathophysiology. It has been shown that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is the neurotrophin responsible for increasing excitability and decreasing inhibition in the posterior horn of the spinal cord in peripheral nerve damage, contributing to the development and maintenance of neuropathic pain (Toth and Moulin, 2013). In addition, the same has been observed in peripheral sensitization, where subcutaneous injection of BDNF modestly decreased heat pain threshold (Thompson et al., 1999).

Considering the traumatic and ischemic etiological aspects involved in peripheral neuropathies, the nitrergic system has been shown to participate in the maintenance of vascular tone, as well as in the modulation of neuropathic pain. All of these three NO synthase (NOS) enzyme isoforms, NOS1 (neuronal NOS, nNOS), NOS2 (inducible NOS, iNOS) and NOS3 (endothelial NOS, eNOS), produce NO differentially, in a manner dependent on the type of tissue (Yang et al., 2012). All three isoforms of NOS, as well as their final product, NO have a modulating effect on neuropathic pain. Overactivation of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors and the formation of peroxynitrite may result in high levels of NOS1 and NOS3, suggesting that these isoforms are critical for painful hypersensitivity. Although high concentrations of NO at the lesion site cause nociception, low concentrations have antinociceptive effects (Hamza et al., 2010).

* Corresponding author at: Florianópolis, Palhoça, Santa Catarina, Brazil.

E-mail address: daniel.martins4@unisul.br (D.F. Martins).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

- 1) O tratamento com BT por 30 minutos, bem como a gabapentina, mas não a iATor, reduziram a dor neuropática quando analisado pelo teste de vF em camundongos;
- 2) A gabapentina e a BT, somente nos tempos de IATM de 10 e 30 minutos, foram capazes de aumentar a força de agarrar dos animais com lesão do nervo isquiático;
- 3) Somente a BT por 30 minutos e a gabapentina preveniram a redução do peso corporal dos animais induzida pela lesão do nervo isquiático;
- 4) Tanto a BT por 30 minutos quanto a iATor apresentaram menor imunoconteúdo de BDNF e NOS2 na medula espinal;
- 5) O Tratamento com BT por 30 minutos aumentou o imunoconteúdo BDNF na pata dos camundongos;

Como limitações deste estudo destaca-se: i) o fato de que a utilização do teste de von Frey é limitada a verificação de reflexos mecânicos periféricos, não possibilitando inferir sobre a atividade de regiões supra-espinais envolvidas no processamento da dor; ii) também não foi possível avaliar a hiperalgesia térmica ao frio, componente importante da avaliação sensorial na dor neuropática; iii) os resultados foram obtidos em modelo animal não sendo possível afirmar que o mesmo comportamento aconteça em seres humanos; e, por fim, iv) os dados foram obtidos em ambiente laboratorial e não no ambiente original das ATM.

O conjunto de experimentos dessa tese demonstrou pela primeira vez que a BT realizada com água termal de nascentes naturais de Santo Amaro da Imperatriz-Brasil produz analgesia em um modelo de dor neuropática em murino.

Nossa hipótese foi confirmada, uma vez que os efeitos benéficos da BT na dor inflamatória também foram observados na dor neuropática. O presente estudo fornece dados experimentais *in vivo* valiosos, baseados em um modelo de dor

neuropática murina, para estabelecer os efeitos da BT com água termal das nascentes naturais de Santo Amaro da Imperatriz, Brasil, usando testes funcionais e análises bioquímicas. Além disso, os resultados aqui obtidos fornecem evidências experimentais que podem apoiar estudos clínicos com dor neuropática.

REFERÊNCIAS

1. Selecki BR, Ring IT, Simpson DA, Vanderfield GK, Sewe IMF. Trauma to the central and peripheral nervous systems. PartII: a statistical profile of surgical treatment in New South Wales. *Aust NZ J Surg.* 1982; 52:111–116.
2. Stone L, Keenan MA. Peripheral nerve injuries in the adult with traumatic brain injury. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; 233:136–144.
3. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;16(3):17002.
4. Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain. Seattle: IASP Press;1994.
5. Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain.* 2005;118(3):289-305.
6. Ministério da Saúde (Brasil), Portaria SAS/MS nº 1083, de 02 de outubro de 2012. Brasília: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Dor Crônica.
7. Cheung CW, Choi SW, Wong SSC, Lee Y, Irwin MG. Changes in Prevalence, Outcomes, and Help-seeking Behavior of Chronic Pain in an Aging Population Over the Last Decade. *Pain Pract.* 2017; 17(5):643-654.
8. Fdrstermann, U., Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, et al. Isoforms of nitric oxide synthase: characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* 1991; 42:1849-1857.
9. Yang HC, Auh QS, Lee J, Ro JY . Masseter inflammation differentially regulates three nitric oxide synthases in the rat trigeminal subnucleus caudalis. *Arch Oral Biol.* 2012;57:1141–1146
10. Hamza M, Wang XM, Wu T, Brahim JS, Rowan JS, Dionne RA. Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation. *Mol Pain.* 2010;6:55.
11. Zochodne DW, Cheng C. Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips. *J Anat.* 2000;196:279–283
12. Trang T, Beggs S, Salter MW. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol.* 2011;7(1):99–108.
13. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain- derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med.* 1999;189:865–870.
14. Batchelor PE, Liberatore GT, Porritt MJ, Donnan GA, Howells DW. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. *Eur J Neurosci.* 2000;12:3462–3468.

15. Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain- derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1990;10:3469–3478.
16. Wong KM, Babetto E, Beirowski B. Axon degeneration: Make the Schwann cell great again. *Neural Regeneration Research*. 2017;12, 518–524.
17. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates III JR, Lafaille JJ, et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*. 2013;155:1596–1609.
18. Hildebrand ME , Xu J, Dedek A , Li Y , Sengar AS, Beggs S, et al. Potentiation of Synaptic GluN2B NMDAR Currents by Fyn Kinase Is Gated through BDNF-Mediated Disinhibition in Spinal Pain Processing. *Cell Rep*. 2016;17(10):2753–2765.
19. Huang J, Zhang Y, Lu L, Hu X, Luo Z. Electrical stimulation accelerates nerve regeneration and functional recovery in delayed peripheral nerve injury in rats. *Eur J Neurosci*. 2013;38(12):3691–3701.
20. Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Qasim M, Zafar S, et al. Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. *Int J Biol Sci*. 2020;1;16(1):116-134.
21. Bender T, Karagülle Z, Bálint GP, Gutenbrunner C, Bálint PV, Sukenik S. Hydrotherapy, balneotherapy, and spa treatment in pain management. *Rheumatol Int*. 2005;25(3):220-4.
22. Oral A, Ilieva EM, Küçükdeveci AA, Varela E, Valero R, Berteau M, et al. Generalised and regional soft tissue pain syndromes: The role of physical and rehabilitation medicine physicians. The European perspective based on the best evidence. A paper by the UEMS-PRM Section Professional Practice Committee. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2013;49(4):535-49.
23. Madeira F. Avaliação dos efeitos da imersão diária em água termomineral de Caldas da Imperatriz/SC na inflamação periférica em camundongos [dissertação]. Palhoça: Universidade do Sul de Santa Catarina; 2016.
24. Forestier R, Erol Forestier FB, Francon A. Spa therapy and knee osteoarthritis: A systematic review. *Ann Phys Rehabil Med*. 2016;59(3):216-226.
25. Antonelli M, Donelli D. Hot sand baths (psammotherapy): A systematic review. *Complement Ther Med*. 2019;42:1-6.
26. Onat ŞŞ, Taşoğlu Ö, Güneri FD, Özişler Z, Safer VB, Özgirgin N. The effectiveness of balneotherapy in chronic low back pain. *Clin Rheumatol*. 2014;33(10):1509-15.
27. Roques CF, Queneau P. SPA therapy for pain of patients with chronic low back pain, knee osteo-arthritis and fibromyalgia. *Bull Acad Natl Med*. 2016; 200(3):575-86.

28. Ministério da Saúde (Brasil), Portaria n. 971/2006. Brasília: Política Nacional das Práticas Integrativas e Complementares; 2006.
29. Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional (COFFITO), Resolução n. 380/2010. Brasília: Regulamenta o uso pelo Fisioterapeuta das Práticas Integrativas e Complementares de Saúde e dá outras providências; 2010.
30. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008;31;137(3):473-7.
31. Kosek E, Cohen M, Baron R, Gebhart GF, Mico JA, Rice AS, et al. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain*. 2016; 157(7):1382-6.
32. Smith BH, Elliott AM, Chambers WA. The impact of chronic pain in the community. *Fam Pract*. 2001;18:292-9
33. Carr DB, Goudas LC. Acute pain. *Lancet*, 1999;353:2051-2058.
34. Stone L, Keenan MA. Peripheral nerve injuries in the adult with traumatic brain injury. *Clin Orthop Relat Res*.1988;233: 136–144.
35. Souza JB, Grossmann E, Perissinotti DMN, de Oliveira Junior JO, da Fonseca PRB, Posso IP. Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. *Pain Res Manag*. 2017;2017:4643830.
36. Mor D, Kendig MD, Kang JWM, Gemikonakli G, Austin PJ, Kalman E, et al. Peripheral nerve injury impairs the ability to maintain behavioural flexibility following acute stress in the rat. *Behav Brain Res*. 2017;1 5;328:123-129.
37. Chimenti RL, Frey-Law LA, Sluka KA. A Mechanism-Based Approach to Physical Therapist Management of Pain. *Phys Ther*. 2018; 98(5):302-314.
38. Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, et al. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 2011;152(10):2204-5.
39. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011;152: 2–15.
40. Baron R, Hans G, Dickenson AH. Peripheral input and its importance for central sensitization. *Ann. Neurol*. 2013;74:630–636.
41. Gagnon M. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nat. Med*. 2013;19:1524–1528.
42. Tsuda M, Beggs S, Salter MW, Inoue K. Microglia and intractable chronic pain. *Glia*. 2013;61:55–61.
43. Austin PJ, Moalem-Taylor G. Pathophysiology of neuropathic pain: inflammatory mediators. In Toth C, Moulin DE, (editors). *Neuropathic Pain*. 2013;(7):77-89.

44. Haroutounian S, Nikolajsen L, Bendtsen TF, Finnerup NB, Kristensen AD, Hasselstrøm JB, et al. Primary afferent input critical for maintaining spontaneous pain in peripheral neuropathy. *Pain*. 2014;155:1272–1279.
45. Tesfaye S, Boulton AJ, Dickenson AH. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. *Diabetes Care*. 2013; 36:2456–2465.
46. Fields HL, Rowbotham M, Baron R. Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. *Neurobiol. Dis.* 1998;5:209–227.
47. Klusáková I, Dubový P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. *Ann Anat.* 2009; 191(3):248-59.
48. Swett, JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa ChM, Miller PG. Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp. Neurol.* 1991;114:82–103.
49. Akintola T, Raver C, Studlack P, Uddin O, Masri R, Keller A. The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. *Neurobiol Pain*. 2017;2:13-17.
50. Harte SE, Meyers JB, Donahue RR, Taylor BK, Morrow TJ. Mechanical Conflict System: A Novel Operant Method for the Assessment of Nociceptive Behavior. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150164.
51. Bobinski F, Teixeira JM, Sluka KA, Santos ARS. Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. *Pain*. 2018;159(3):437-450.
52. Starowicz K, Przewlocka B. Modulation of neuropathic-pain-related behaviour by the spinal endocannabinoid/endovanilloidsystem. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;5(1607):3286-99.
53. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990; 43(2):205-18.
54. Challa SR. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *Int J Neurosci*. 2015;125(3):170-4.
55. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(4):299-309.
56. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549-553.
57. Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci*. 2006; 29: 507–38.
58. Sasi M, Vignoli B, Canossa M, Blum R. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch*. 2017;469(5-6):593-610.

59. Barbacid M. Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;766:442-458.
60. Giardini AC. Efeitos da mobilização neural nas células da glia e no fator neurotrófico derivado do cérebro para controle da dor neuropática. [dissertação]. Universidade de São Paulo, 2013.
61. Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci.* 2002;5:1131–1136.
62. Trang T, Beggs S, Salter MW. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol.* 2011;7:99–108
63. Nijs J, Meeus M, Versijpt J, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a driving force behind neuroplasticity in neuropathic and central sensitization pain: a new therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(4):565–576.
64. Alder J, Thakker-Varia S, Crozier RA, Shaheen A, Plummer MR, Black IB. Early presynaptic and late postsynaptic components contribute independently to brain-derived neurotrophic factor-induced synaptic plasticity. *J Neurosci.* 2005;25:3080–3085.
65. Kim HJ. Effects of long-term inhibition of EAAT2 on the excitability of spinal dorsal horn neurons. [Thesis]. University of Alberta, 2011.
66. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission.* 2014;121(8), 799–817.
67. Li S, Cai J, Feng ZB, Jin ZR, Liu BH, Zhao HY, et al. BDNF Contributes to Spinal Long-Term Potentiation and Mechanical Hypersensitivity Via Fyn-Mediated Phosphorylation of NMDA Receptor GluN2B Subunit at Tyrosine 1472 in Rats Following Spinal Nerve Ligation. *Neurochem Res.* 2017;42:2712-2729.
68. Weng HR, Chen JH, Cata JP. Inhibition of glutamate uptake in the spinal cord induces hyperalgesia and increased responses of spinal dorsal horn neurons to peripheral afferent stimulation. *Neuroscience.* 2006;138:1351-1360.
69. Rask CA, Biological actions of nerve growth factor in the peripheral nervous system, *Eur. Neurol.* 1999;41Suppl1:14-19.
70. Vivoli E, Di Cesare Mannelli L, Salvicchi A, Bartolini A, Koverech A, Nicolai R, et al. Acetyl-L-carnitine increases artemin level and prevents neurotrophic factor alterations during neuropathy. *Neuroscience.* 2010;167(4),1168–1174.
71. Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model, *J. Neurosci.* 2001;21:4891-4900.

72. Cho HJ, Kim JK, Park HC, Kim DS, Ha SO, et al. Changes in brain derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia, spinal cord, and gracile nuclei following cut or crush injuries, *Exp. Neurol.* 1998;154:224-230.
73. Zhang Y, Wang Y, Zhang X et al. Proteomic analysis of differential proteins related to the neuropathic pain and neuroprotection in the dorsal root ganglion following its chronic compression in rats. *Exp Brain Res.* 2008;189:199–209.
74. Tsantoulas C, Zhu L, Shaifita Y, Grist J, Ward JPT, Raoufet R, et al. Sensory neuron downregulation of the Kv9.1 potassium channel subunit mediates neuropathic pain following nerve injury. *J. Neurosci.* 2012;32:17502-17513.
75. Cao XH, Byun HS, Chen SR, Cai YQ, Pan HL. Reduction in voltage-gated K⁺ channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurochem.* 2010;114:1460–1475.
76. Berkefeld H, Fakler B, Schulte U. Ca²⁺-Activated K⁺ Channels: From Protein Complexes to Function. *Physiological Reviews.* 2010;90(4): 1437–1459.
77. Abdulla FA, Smith PA. Changes in Na⁺ channel currents of rat dorsal root ganglion neurons following axotomy and axotomy- induced autotomy. *J Neurophysiol.* 2002;88:2518–2529.
78. Everill B, Cummins TR, Waxman SG, Kocsis JD. Sodium currents of large (Aβ-type) adult cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons display rapid recovery from inactivation before and after axotomy. *Neuroscience.* 2001;106:161–169.
79. Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG. Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci.* 2010; 33:325–347.
80. Waxman SG, Zamponi GW. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience.* 2014;17(2):153–163.
81. Schmidt, André Prato, & Schmidt, Sérgio Renato Guimarães. O comportamento dos canais iônicos controlados por diferença de potencial elétrico e dos receptores do tipo Toll na fisiopatologia da dor neuropática. *Revista Dor.* 2016;17(Suppl. 1):43-45.
82. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* 2002;5(suppl. 1):1062–1067.
83. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001; 413:203–210.
84. Ahlawat A, Rana A, Goyal N, Sharma S. Potential role of nitric oxide synthase isoforms in pathophysiology of neuropathic pain. *Inflammopharmacology.* 2014;22(5):269-78
85. Guix FX, Uribealago I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol.* 2005;76(2):126-52.

86. Cho HS, Shin YS, Lee YH, Cho WH, Ko YK. Relationship between neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the dorsal root ganglia during neuropathic pain. *Korean J Anesthesiol.* 2009;57(3):342–34.
87. Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(12):939-50.
88. Hara MR, Snyder SH. Cell signaling and neuronal death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:117-41.
89. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 2000;184(3):409-20.
90. Calabrese V, Mancuso C, Calvani C. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 10:766–77.
91. Persechini A, Tran QK, Black DJ, Gogol EP. Calmodulin-induced structural changes in endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 2013;587(3):297–301.
92. Luo ZD, Cizkova D. The role of nitric oxide in nociception. *Current Rev Pain.* 2000; 4(6):459–466.
93. Chen G, Tanabe K, Yanagidate F, Kawasaki Y, Zhang L, Dohi S, Iida H. Intrathecal endothelin-1 has antinociceptive effects in rat model of postoperative pain. *Eur J Pharmacol.* 2012; 697(1-3):40–46.
94. Stavniichuk R, Shevalye H, Lupachyk S. Peroxynitrite and protein nitration in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014; 30(8):669-78.
95. Narenjkar J, Roghani M, Alambeygi H, Sedaghati F. The effect of the flavonoid quercetin on pain sensation in diabetic rats. *Basic Clin Neurosci.* 2011; 2(3):51–57.
96. Mungrue IN, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand.* 2003 Oct;179(2):123-35.
97. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012 Apr;33(7):829-37,837a-837d.
98. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2002 Dec 1;33(11):1451-64.
99. Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, Muscoli C, Mollace V, Ndengele M, Ischiropoulos H, Salvemini D. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Jun;309(3):869-78
100. Little JW, Doyle T, Salvemini D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids.* 2012 Jan;42(1):75-94.

101. Mukherjee P, Cinelli MA, Kang S, Silverman RB. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chem Soc Rev*. 2014;43(19):6814-38.
102. Schmidtke A, Tegeder I, Geisslinger G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci*. 2009;32(6):339–346.
103. Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Nitric oxide blocks fast, slow, and persistent Na channels in C-type DRG neurons by S-nitrosylation. *J Neurophysiol*. 2002;87(2):761–775.
104. Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain*. 2007;131:262–27.
105. Zhang N, Inan S, Cowan A, Sun R, Wang JM, Rogers TJ, et al. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:4536–4541.
106. Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S. Macrophage inflammatory protein-1 alpha mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 beta up-regulation. *Pain*. 2010;149:305–315.
107. Oh SB, Tran PB, Gillard SE, Hurley RW, Hammond DL, Miller RJ. Chemokines and glycoprotein 120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. *J Neurosci*. 2001;21:5027–503.
108. Levy D, Kubes P, Zochodne DW. Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60(5):411–421.
109. Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(5–6):929–947.
110. Pavlov VIA, Obrosova IG. Inducible nitric oxide synthase gene deficiency counteracts multiple manifestations of peripheral neuropathy in a streptozotocin-induced mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51(11):2126–2133.
111. Borsani E, Buffoli B, Bonazza V, Reiter RJ, Rezzani R, Rodella LF. Single Administration of Melatonin Modulates the Nitroxidergic System at the Peripheral Level and Reduces Thermal Nociceptive Hypersensitivity in Neuropathic Rats. *Int J Mol Sci*. 2017;14:18(10).
112. Heck DE, Laskin DL, Gardner CR, Laskin JD. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *J Biol Chem*. 1992;267(30):21277-80.
113. Cals-Grierson MM, Ormerod AD. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide*. 2004; 10(4):179-93.

114. Frank S, Madlener M, Pfeilschifter J, Werner S. Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol.* 1998;111(6):1058-64.
115. Goldsmith PC, Leslie TA, Hayes NA, Levell NJ, Dowd PM, Foreman JC. Inhibitors of nitric oxide synthase in human skin. *J Invest Dermatol.* 1996; 106(1):113-8.
116. Pang Z, Sakamoto T, Tiwari V. Selective keratinocyte stimulation is sufficient to evoke nociception in mice. *Pain.* 2015;156(4):656–665.
117. Choi KL, Sauder DN. The role of Langerhans cells and keratinocytes in epidermal immunity. *J Leukoc Biol.* 1986;39(3):343–358.
118. Radtke C, Vogt PM, Devor M, Kocsis JD. Keratinocytes acting on injured afferents induce extreme neuronal hyperexcitability and chronic pain. *Pain.* 2010;148(1):94–102.
119. Sloniecka M, Le Roux S, Boman P, Bystrom B, Zhou Q, Danielson P. Expression profiles of neuropeptides, neurotransmitters, and their receptors in human keratinocytes in vitro and in situ. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134157.
120. Cunha TM, Verri WA, Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(5):1755–1760.
121. Manjavachi MN, Costa R, Quintao NL, Calixto JB. The role of keratinocyte-derived chemokine (KC) on hyperalgesia caused by peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology.* 2014;79:17–27.
122. Cook SP, McCleskey EW. Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain.* 2002;95(1–2):41–47.
123. Hilliges M, Wang L, Johansson O. Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1995; 104(1):134–137.
124. Albers KM, Davis BM. The skin as a neurotrophic organ. *Neuroscientist.* 2007;13(4):371–382.
125. Hou Q, Barr T, Gee L. Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide beta: implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. *Pain.* 2011;152(9):2036–2051.
126. Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan Jr TP. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:3093–3098.
127. Khodorova A, Montmayeur JP, Strichartz G. Endothelin Receptors and Pain. *The Journal of Pain.* 2009;10(1)2- 28.

128. Charkoudian N. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(5):603-12.
129. Roberts MF, Wenger CB, Stolwijk JA, Nadel ER. Skin blood flow and sweating changes following exercise training and heat acclimation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1977;43(1):133-7.
130. Brooks EM, Morgan AL, Pierzga JM, Wladkowski SL, O'Gorman JT, Derr JA, et al. Chronic hormone replacement therapy alters thermoregulatory and vasomotor function in postmenopausal women. *J Appl Physiol.* 1997;83(2):477-84.
131. Hashim MA, Tadepalli AS. Cutaneous vasomotor effects of neuropeptide Y. *Neuropeptides.* 1995;29(5):263-71.
132. Pérgola PE, Kellogg DL Jr, Johnson JM, Kosiba WA. Reflex control of active cutaneous vasodilation by skin temperature in humans. *Am J Physiol.* 1994;266(5 Pt 2):H1979-84.
133. Shastry S, Minson CT, Wilson SA, Dietz NM, Joyner MJ. Effects of atropine and L-NAME on cutaneous blood flow during body heating in humans. *J Appl Physiol.* 2000;88(2):467-72.
134. Avellini BA, Shapiro Y, Pandolf KB. Cardio-respiratory physical training in water and on land. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1983;50(2):255-63.
135. Robert JJ, Jones L, Bobo M. The physiologic response of exercising in the water and on land with and without the X1000 Walk'N Tone Exercise Belt. *Res Q Exerc Sport.* 1996;67(3):310-5.
136. Ghersetich I, Lotti TM. Immunologic aspects: immunology of mineral water spas. *Clin Dermatol.* 1996;14(6):563-6.
137. Santos I, Cantista P, Vasconcelos C. Balneotherapy in rheumatoid arthritis-a systematic review. *Int J Biometeorol.* 2016; 60(8):1287-301.
138. Kloesch B, Liszt M, Krehan D, Broell J, Kiener H, Steiner G. High concentrations of hydrogen sulphide elevate the expression of a series of pro-inflammatory genes in fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid and osteoarthritis patients. *Immunol Lett.* 2012; 30;141(2):197-203.
139. Branco M, Rêgo NN, Silva PH, Archanjo IE, Ribeiro MC, Trevisani VF. Bath thermal waters in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized controlled clinical trial. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2016;52(4):422-30.
140. Matsumoto H, Hagino H, Hayashi K, Ideno Y, Wada T, Ogata T, et al. The effect of balneotherapy on pain relief, stiffness, and physical function in patients with osteoarthritis of the knee: a meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2017;36(8):1839-1847.
141. Latorre-Román PÁ, Rentero-Blanco M, Laredo-Aguilera JA, García-Pinillos F. Effect of a 12-day balneotherapy programme on pain, mood, sleep, and depression in healthyelderly people. *Psychogeriatrics.* 2015;15(1):14-9.

142. Klusáková I, Dubový P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. *Ann Anat.* 2009;191(3):248-59.
143. Racine M, Galán S, de la Vega R, Tomé Pires C, Solé E, Nielson WR, et al. Pain-related Activity Management Patterns and Function in Patients With Fibromyalgia Syndrome. *Clin J Pain.* 2018;34(2):122-129.
144. Martins DF, Siteneski A, Ludtke DD, Dal-Secco D, Santos ARS. High-Intensity Swimming Exercise Decreases Glutamate-Induced Nociception by Activation of G-Protein-Coupled Receptors Inhibiting Phosphorylated Protein Kinase A. *Mol Neurobiol.* 2017;54(7):5620-5631.
145. Marković M, Majkić-Singh N, Ignjatović S. Beneficial effects of cellular stress response in traditional spa treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Lab.* 2009;55(5-6):235-41.
146. Silva A, Queiroz SS, Andersen ML, Mônico-Neto M, Campos RM, Roizenblatt S, et al. Passive body heating improves sleep patterns in female patients with fibromyalgia. *Clinics.* 2013;68(2):135-40.
147. Bağdatlı AO, Donmez A, Eröksüz R, Bahadır G, Turan M, Erdoğan N. Does addition of 'mud-pack and hot pool treatment' to patient education make a difference in fibromyalgia patients? A randomized controlled single blind study. *Int J Biometeorol.* 2015; 59(12):1905-11.
148. Koyuncu E, Ökmen BM, Özkuk K, Taşoğlu Ö, Özgirgin N. The effectiveness of balneotherapy in chronic neck pain. *Clin Rheumatol.* 2016; 35(10):2549-55.
149. Karagülle M, Kardeş S, Karagülle MZ. Real-life effectiveness of spa therapy in rheumatic and musculoskeletal diseases: a retrospective study of 819 patients. *Int J Biometeorol.* 2017;61(11):1945-1956.
150. Pittler MH, Karagülle MZ, Karagülle M, Ernst E. Spa therapy and balneotherapy for treating low back pain: meta-analysis of randomized trials. *Rheumatology.* 2006;45,880–884.
151. BRASIL. CONCEA – Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 30 de 02 de fevereiro de 2016. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA.
152. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* 1988;33: 87–107.
153. Madeira F, Brito RN de, Emer AA, Batisti AP, Turnes BL, Salgado A, et al. The role of spinal inhibitory neuroreceptors in the antihyperalgesic effect of warm water immersion therapy. *Brazilian Journal of Physical Therapy.* 2020; S1413-3555(18)30429-5.
154. Martins DF, Prado MRP, Daruge-Neto E, Batisti AP, Emer AA, Mazzardo-Martins L, et al. Caffeine prevents antihyperalgesic effect of gabapentin in an animal

model of CRPS-I: evidence for the involvement of spinal adenosine A1 receptor. *J Peripher Nerv Syst.* 2015;20:403-409.

155. Martins, TC. Análise dos efeitos do treinamento de corrida excêntrica na reabilitação da lesão nervosa traumática periférica [dissertação]. Universidade Federal de Santa Catarina; 2015.

156. Horewicz VV, Crestani S, de Sordi R, Rezende E, Assreuy J. FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. *Eur J Pharmacol.* 2015; 746:267-73.

157. Kojima H, Urano Y, Kikuchi KT, Hirata Y, Nagano T. Fluorescent Indicators For Imaging Nitric Oxide. *Angew Chem Int Ed.* 1999;38:3209-3212, 1999.

ANEXO A – Parecer de aprovação do projeto na CEUA UNISUL



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

Palhoça, 12 de dezembro de 2018
 Registro na CEUA (código): 17.039.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

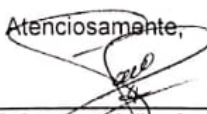
Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Imersão em água termomineral como recurso terapêutico na redução da dor e na Recuperação Morfofuncional de camundongos submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático", registrada com o 17.039.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 12 de dezembro de 2018.

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

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

Atenciosamente,


 Prof. Sandro Melim Sgrott
 Coordenador da Comissão



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

Palhoça, 12 de dezembro de 2018

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 "Imersão em água termomineral como recurso terapêutico na redução da dor e na Recuperação Morfofuncional de camundongos submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático", registrada com o nº 17.039.2.07.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 aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 12 de dezembro de 2018

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2018 a 01/02/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos hetergênicos, <i>Mus musculus</i> , Swiss
Nº de animais	200
Peso/Idade	30-35g/45-60 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina


Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

ANEXO B – Composição provável das águas utilizadas no estudo

COMPOSIÇÃO QUÍMICA PROVÁVEL DA ÁGUA

Bicarbonatos	43,56 mg/l
Cloretos	2,40 mg/l
Brometos	0,05 mg/l
Fluoretos	0,95 mg/l
Fosfato	0,20 mg/l
Nitrato	0,80 mg/l
Sulfato	1,30 mg/l
Cálcio	6,36 mg/l
Estrôncio	0,018 mg/l
Lítio	0,012 mg/l
Magnésio	1,02 mg/l
Potássio	3,85 mg/l
Silício	16,04 mg/l
Sódio	8,62 mg/l
Zinco	0,010 mg/l

Estudos in loco realizados pelo D.N.P.M. de M.M.E. Bol.

Nº 309/Lamin/01 de 19/04/01

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICO DA ÁGUA

Temperatura da Fonte	39,8°C
Radioatividade na fonte em maches	27,06
pH a 25°	6,51
Condutividade elétrica a 25°C em mhos/cm	9,09 x 10⁻⁵
Resíduo de evaporação a 18°C	68,00 mg/l

Estudos in loco realizados pelo D.N.P.M. de M.M.E. Bol.

Nº 309/Lamin/01 de 19/04/01