

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**INSTRUMENTO DE AJUSTE QUIROPRÁTICO (*IMPULSE*®) REDUZ
NOCICEPÇÃO EM PARALELO A ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DE
MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM NERVO ISQUIÁTICO E
MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FRANCIELLE B. O. DA SILVA

PORTO ALEGRE, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**INSTRUMENTO DE AJUSTE QUIROPRÁTICO (*IMPULSE*®) REDUZ
NOCICEPÇÃO EM PARALELO A ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DE
MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM NERVO ISQUIÁTICO E
MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

Francielle B. O. da Silva

Orientadora: Prof. Dra. Wania Aparecida Partata

Co-orientadora: Dra. Carolina Kolberg

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia

PORTO ALEGRE, 2021

FRANCIELLE B. O. DA SILVA

**INSTRUMENTO DE AJUSTE QUIROPRÁTICO (*IMPULSE*®) REDUZ
NOCICEPÇÃO EM PARALELO A ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DE
MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM NERVO ISQUIÁTICO E
MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para a obtenção do título de
mestre em Fisiologia

Orientadora: Prof. Dra. Wania A. Partata

Co-orientadora: Dra. Carolina Kolberg

Banca Examinadora: DR. FÁBIO FRANCISCATTO STIEVEN – FEEVALE

DRA. RENATA PADILHA GUEDES - UFCSPA

DR. LUIZ CARLOS R. KUCHARSKI - UFRGS (RELATOR)

"No mesmo instante em que recebemos pedras em nosso caminho, flores estão sendo plantadas mais longe. Quem desiste não as vê." - William Shakespeare

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha doce e amada mãe Valni Braz Oliveira da Silva e meu amado pai Eduardo Brittes Peres, meu amor Rafael Pacheco, pessoa maravilhosa que amo muito e reapareceu durante o início dessa jornada, que me apoia incondicionalmente e à minha filha Serena Braz Pacheco de Oliveira que chegou no decorrer deste sonho. Filha, a mamãe Te Ama muito!

Sabemos que não foi fácil para chegar até aqui, mas vencemos! Foram noites sem dormir, consultório fechado, sonhos que ficaram para depois, para que esse se concretizasse. Vocês que me deram força, quando eu fadiguei, vocês os meus maiores professores, me ensinaram que na vida basta ter amor, basta ter fé.

Muito obrigada por tudo! A vocês eu dedico os louros dessa conquista. Muitos foram os obstáculos, as dificuldades, mas foram a solidez, força de vontade e dedicação de vocês que me mantiveram firme nessa jornada... Hoje é a concretização de um sonho!! Que muito distante, talvez inalcançável, mas chegou!!! Hoje... Agora... Eu sei que eu sou...Mestra em Fisiologia Humana! Nós conseguimos!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida, por ser meu guia e minha proteção, por iluminar meu caminho inserindo a Fisiologia à minha vida, e permitir que eu vá muito mais além do que eu possa imaginar.

In memoriam meu pai, meu herói Santino Nicanor da Silva que está em outra dimensão, seus ensinamentos serão presença constante em minha vida... Pai anjo que me ama e protege independente de onde estiver... Se longe ou debaixo de suas asas... Nosso amor é incondicional.

À minha orientadora, prof^a Dra. Wania Aparecida Partata, por aceitar o desafio de ser orientadora de uma aluna que mal conhecia provida apenas de vontade e um desejo de compreender e contribuir para o crescimento de sua profissão. Muito grata pela confiança, amizade, sabedoria, dedicação pelas inúmeras horas despendidas e por acreditar que nosso trabalho daria certo, pois ela foi indispensável para que este trabalho fosse realizado.

À minha Co-orientadora, Dra. Carolina Kolberg, que é minha grande inspiração como pessoa e profissional, que não mediu esforços para me ajudar no maior desafio dessa jornada, a Qualificação. E foi minha grande inspiração para querer ingressar no mestrado em Fisiologia.

Às minhas colegas de laboratório Maria, Thaisla, Elza, Clívia, Ana, obrigada pelo profissionalismo, coleguismo, ensinamentos, ajuda e paciência. Destaque especial para a colega de laboratório, Dra. Adarly Kroth, obrigada pela amizade, pela ajuda, pelos muitos momentos que atuou como minha mentora, prestando o seu auxílio nos experimentos e discutindo, tanto aspectos técnicos como aspectos profissionais, relevantes para nossa pesquisa.

Ao colega Dr. Felipe Duarte, pelo conhecimento compartilhado e ajuda na redação do artigo.

Aos professores do PPG Fisiologia, muito obrigado pelo conhecimento compartilhado, em especial ao professor Dr. Guilherme Baldo. Obrigada por acreditar em mim.

À Profa. Dra. Renata Rosat, por seus ensinamentos, conselhos e por sua ajuda em momentos fundamentais.

Ao colega de profissão Daniel Facchini, por intermédio dele pude realizar o experimento com o aparelho quiroprático *Impulse*®.

Ao Dr. Christopher J. Colloca, por disponibilizar o aparelho *Impulse*®.

À minha tutora, segunda mãe, amiga e sogra, Maria Lucia Gomes Pacheco, por me apoiar. Assim como meu sogro Renato de Oliveira Pacheco, obrigada pelo incentivo e apoio sempre.

E por fim, ao CNPQ, pelo suporte financeiro prestado.

RESUMO

Título: INSTRUMENTO DE AJUSTE QUIROPRÁTICO (*IMPULSE*®) REDUZ NOCICEPÇÃO EM PARALELO A ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM NERVO ISQUIÁTICO E MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA

Autora: FRANCIELLE B. O. DA SILVA

Orientadora: WANIA APARECIDA PARTATA

Co-Orientadora: CAROLINA KOLBERG

As espécies reativas de oxigênio desempenham papel importante nos distúrbios da dor neuropática. A dor neuropática é definida como a dor resultante de lesão ou doença no sistema nervoso somatossensitivo, sistema que fornece informações sobre o corpo, incluindo pele, músculo esquelético e órgãos viscerais. O tratamento de quiropraxia tem demonstrado efeito benéfico no controle da dor clínica, hiperalgesia mecânica e térmica, e modulou parâmetros oxidativos em sangue de humanos e ratos com dor. No presente estudo se avaliou, pela primeira vez, o efeito do ajuste quiroprático assistido por *Impulse*® (AQAI) na nocicepção e marcadores de estresse oxidativo em medula espinal e nervo isquiático de ratos com dor neuropática. A dor neuropática foi induzida por lesão por constrição crônica no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), um modelo amplamente usado na literatura para induzir dor neuropática. Após, os animais foram aleatoriamente designados para CCI com e sem quiropraxia. O ajuste quiroprático foi instrumentalmente assistido, utilizando-se o *Impulse*®, um instrumento eletromecânico que dispara pulsos de ondas de choque e é usado no manejo de distúrbios musculoesqueléticos. O instrumento foi aplicado no processo espinhoso lombar de L4-L5, 3 vezes/semana, durante 2 semanas. As principais medidas avaliadas foram limiar mecânico e latência de retirada da pata a estímulo térmico, e marcadores pró-oxidativos e antioxidantes na medula espinal e no nervo isquiático dos ratos. Em comparação com ratos CCI sem terapia, o tratamento com AQAI provocou aumento estatisticamente significativo no limiar mecânico e na latência de retirada da pata a estímulo térmico, os quais foram reduzidos pela CCI. Na medula espinal, a intervenção quiroprática preveniu aumento na geração de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, aumentos encontrados nesse tecido de ratos CCI sem terapia. A concentração de hidroperóxidos lipídicos da medula espinal e do nervo isquiático foi diminuída pela intervenção quiroprática. A capacidade antioxidante total aumentou na medula espinal e no nervo isquiático de ratos CCI com e sem ajuste quiroprático. Tanto a CCI como o ajuste quiroprático não alteraram significativamente o conteúdo de tióis totais da medula espinal. Esses resultados estimulam pesquisas futuras a explorarem o efeito analgésico da terapia e sugere a relevância do estresse oxidativo como um mecanismo potencial subjacente ao ajuste quiroprático.

Palavras-chave: Limiar mecânico, limiar térmico, geração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, tióis totais, hidroperóxidos lipídicos.

ABSTRACT

Title: Chiropractic adjusting instrument (*Impulse*®) decreases nociception in parallel to changes in oxidative-stress markers in the spinal cord and sciatic nerve of rats with neuropathic pain

Author: FRANCIELLE B. O. DA SILVA

Advisor: WANIA APARECIDA PARTATA

Co-Advisor: CAROLINA KOLBERG

Reactive oxygen species play an important role in neuropathic pain disorders. Neuropathic pain is defined as pain caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system. The somatosensory nervous system provides information about the body including skin, musculoskeletal, and visceral organs. Chiropractic exerted a beneficial effect in clinical pain outcomes, mechanical and thermal hyperalgesia, and modulated oxidative parameters in the blood of humans and rats with pain. The present study aimed to determine, for first time, the effect of *Impulse*®-assisted spinal manipulative therapy (ISMT) on nociception and oxidative stress markers in spinal cord and sciatic nerve of rats with neuropathic pain. Neuropathic pain was induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain. After, animals were randomly assigned to CCI with and without ISMT. *Impulse*® is an electromechanical instrument that triggers shockwave pulses and is used for the management of musculoskeletal disorders. The ISMT was applied to lumbar spinous process of L4-L5, 3 times/week, for 2 weeks. Mechanical threshold and latency to paw withdrawal to thermal stimulus, and pro-oxidative and antioxidant markers in the spinal cord and in the sciatic nerve were the main outcomes evaluated. ISMT significantly increased mechanical threshold and latency to paw withdrawal to thermal stimulus, measures that increased in CCI rats without therapy. In the spinal cord, ISMT prevented the increase in superoxide-anion generation and hydrogen-peroxide levels, alterations found in CCI rats without therapy. Lipid hydroperoxide levels both in the spinal cord and in the sciatic nerve were attenuated by chiropractic intervention. Total antioxidant capacity increased in spinal cord and sciatic nerve of CCI rats with and without chiropractic intervention. CCI and chiropractic therapy did not significantly change total thiol content of the spinal cord. Thus, our work claims future research exploring the analgesic effect of therapy and suggests the relevance of oxidative stress as a potential underlying mechanism of chiropractic therapy.

Keywords: Mechanical threshold, thermal threshold, superoxide anion generation, hydrogen peroxide, total thiols, lipid hydroperoxides.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinal lombar, ilustrando a formação do nervo isquiático20
- Figura 2: Redução do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O) pela ação de enzimas NADPH oxidases (NO_x) e da fosforilação oxidativa (FOx).....23
- Figura 3: As fotografias mostram a sequência dos procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos.....31
- Figura 4: Aplicação de *Impulse*[®] sobre a região do processo espinhoso de L4-L5 de um rato.....32
- Figura 5: Aparelho analgesímetro digital (A) usado no teste de von Frey digital para determinar o limiar mecânico 34
- Figura 6: Esquema mostrando o aparelho usado no teste da placa quente.....35
- Figura 7: Esquema temporal mostrando os dias das avaliações do limiar mecânico (LM) e da latência de retirada da pata a estímulo térmico (LT), da realização do procedimento cirúrgico, da eutanásia, e dos dias da terapia com ajuste quiroprático assistido por *Impulse*[®] (AQAI).....36
- Figura 8: Medida do limiar mecânico em ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse*[®] (AQAI).....44
- Figura 9: Medida da latência de retirada da pata a estímulo térmico em ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse*[®] (AQAI).....46
- Figura 10: Valores de hidroperóxidos lipídicos (A) e capacidade antioxidante total (TAC) em nervo isquiático de ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse*[®] (AQAI).....48
- Figura 11: Valores da formação de ânion superóxido (SAG) (A), de peróxido de hidrogênio (B) e de hidroperóxidos lipídicos (C) na medula espinal de ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse*[®] (AQAI).....50
- Figura 12: Capacidade antioxidante total (TAC) (A) e conteúdo de tióis totais (B) na medula espinal de ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse*[®] (AQAI).....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores dos picos de força e da pressão do instrumento de ajuste quiroprático *Impulse*® adaptado pelo fabricante para uso em estudos pré-clínicos em seus três níveis de força (I, II e III).....42

Tabela 2: Diferença de média (MD) e intervalos de confiança (IC) dos picos de força e de pressão para as comparações entre os níveis de força (I, II e III) do instrumento de ajuste quiroprático *Impulse*® adaptado pelo fabricante para uso em estudos pré-clínicos.....42

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS^{•+} – 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato)
- ANOVA – análise de variância
- BHT – butil-hidroxitolueno
- CAT – enzima catalase
- CCI – constrição no nervo isquiático (do inglês, *chronic constriction injury*)
- CID – classificação internacional de doenças
- CREAL – centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório
- DP – desvio padrão
- DRG – gânglio da raiz dorsal (do inglês *dorsal root ganglia*)
- DTNB – ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico)
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- FOx – fosforilação oxidativa
- GABA – ácido gama-aminobutírico
- GMAp – Grupo de Mecânica Aplicada
- GPx – glutationa peroxidase
- H₂O – água
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- IASP – *International Association for the Study of Pain*
- IC – intervalo de confiança
- KCl – cloreto de potássio
- LM – limiar mecânico
- LT – limiar térmico
- MEOH – metanol absoluto
- AQAI- ajuste quiroprático assistido por *Impulse*®
- NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NBT – azul de nitrotetrazol
- NOx – NADPH oxidases
- O₂ – oxigênio molecular
- O₂^{•-} – ânion superóxido
- OH[•] – radical hidroxil
- PBS – tampão fosfato-salina

PMSF – fenil-metil-sulfonil fluoreto

ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)

SAG – geração de ânion superóxido

SNC – sistema nervoso central

SOD – enzima superóxido dismutase

TAC – capacidade antioxidante total

TPP – trifenilfosfina

XO – xilenol laranja

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELA.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
SUMÁRIO.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Dor e nocicepção	16
1.2 Uso de modelos animais no estudo da dor neuropática.....	19
1.3 Espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes: alterações na dor neuropática.....	21
1.4 Terapia por manipulação quiroprática	23
2. HIPÓTESE	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais: procedência e manutenção	29
4.2 Delineamento experimental.....	29
4.3 Constrição no nervo isquiático	30
4.4 Aplicação de <i>Impulse</i> ®.....	31
4.5 Determinação dos valores do pico de força e de pressão do <i>Impulse</i> ®.....	32
4.6 Parâmetros nociceptivos	33
4.6.1 Determinação do limiar mecânico.....	33
4.6.2 Determinação da latência de retirada da pata a estímulo térmico	34
4.7 Preparo das amostras.....	36
4.8 Parâmetros de estresse oxidativo	37
4.8.1 Formação de ânion Superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	37
4.8.2 Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2).....	37
4.8.3 Hidroperóxidos lipídicos	38
4.8.4 Capacidade antioxidante total.....	38
4.8.5 Tióis totais	39
4.9 Análise estatística	39

4.10 Disposição final dos resíduos da pesquisa.....	40
4.10.1 Resíduos químicos	40
4.10.2 Resíduos biológicos	40
5. RESULTADOS	41
5.1 Valores dos picos de força e de pressão.....	41
5.2 Parâmetros nociceptivos	43
5.2.1 Limiar mecânico.....	43
5.2.2 Latência de retirada da pata a estímulo térmico.....	45
5.3 Parâmetros de estresse oxidativo no nervo isquiático.....	47
5.4 Parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal	49
5.4.1 Pró-oxidante.....	49
5.4.2 Antioxidante.....	51
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO.....	61
8. PERSPECTIVAS.....	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO I.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor constitui um dos componentes essenciais do sistema de defesa do organismo (FEIN, 2011). De acordo com a definição dada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, *International Association for the Study of Pain*), a dor é uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial. Nesse sentido, a dor pode se referir a sensações como irritação, ardência, inflamação ou latejar, geralmente sensações que são provenientes de alguma parte ou partes do corpo e constituem uma sensação de caráter subjetivo (THOMPSON et al., 2017; CAREY & AS-SANIE, 2016; MACHELSKA & CELIK, 2016; BALIKI & APKARIAN, 2015; OSSIPOV et al., 2014; BASBAUM et al., 2009; VANDERAH, 2007; LOESER, 2001; MILLAN, 1999). A subjetividade da sensação dolorosa se deve ao fato da informação nociceptiva não se destinar apenas às regiões do sistema somatossensitivo ou somatossensorial (sistema que transmite informações táteis, proprioceptivas, nociceptivas, viscerais e térmicas), mas também a regiões que compõem o chamado sistema límbico, o sistema que compreende as várias áreas corticais e subcorticais envolvidas no processamento das emoções (BALIKI AND APKARIAN, 2015; BASBAUM et al., 2009; VANDERAH, 2007; BEYES & BONICA, 2001; MILLAN, 1999). Sendo assim, a dor pode ser modulada por vários fatores cognitivos, tais como distração, atenção, emoções e elementos socioculturais (WIECH, 2016; COHEN; MAO, 2014; LOESER; TREEDE, 2008; PIMENTA, 1998; MEINELT et al., 2007).

O termo dor é diferente de nocicepção. A nocicepção se refere à atividade que ocorre no sistema nervoso em resposta a um estímulo nocivo (DESANTANA et al., 2020). Os nociceptores fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos. A nocicepção, portanto, aparece como o objeto de estudo mais apropriado nas abordagens para o estudo da dor onde são empregados modelos animais, que são incapazes de verbalizar sua percepção do fenômeno doloroso (KAVALIERS, 1988).

Geralmente a dor acompanha a nocicepção (FEIN, 2011). De modo geral, os eventos que modulam a transmissão nociceptiva ocorrem primariamente no corno dorsal da medula espinal e em núcleos do tronco encefálico, por serem essas as principais regiões de entrada de informações nociceptivas no sistema nervoso central (SNC). Posteriormente, a informação nociceptiva é modulada em centros encefálicos e estruturas corticolímbicas (FEIN, 2011).

Embora a dor geralmente cumpra um papel adaptativo, ela pode ter efeitos adversos na função e no bem-estar social e psicológico de um indivíduo. A Declaração de Montreal, documento desenvolvido durante o primeiro Encontro Internacional de Dor em 3 de setembro de 2010, declara que o “acesso ao tratamento da dor é um direito humano fundamental” (DESANTANA et al., 2020).

Uma característica da dor é que ela pode variar muito quanto à intensidade, duração e qualidade. Quanto à intensidade, a dor é classificada em leve, moderada ou severa. Quanto à duração, a classificação da dor é em aguda ou crônica. A dor aguda é aquela que se manifesta transitoriamente durante um período relativamente curto, de minutos a algumas semanas, e está associada a lesões em tecidos ou órgãos ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo, entre outras causas. Normalmente ela desaparece após o tratamento apropriado. Possui papel protetor ao indivíduo acometido por ela. A dor crônica pode ser definida como a dor contínua ou recorrente de duração mínima de 3 meses; sua função é de alerta e, muitas vezes, tem a etiologia incerta, não desaparece com o emprego dos procedimentos terapêuticos convencionais e é a causa de incapacidades e inabilidades prolongadas. A dor crônica foi recentemente incluída na Classificação Internacional de Doenças (CID). Ela consta na CID-11 com 7 subcategorias, sendo 1 primária e 6 secundárias (TREEDE et al., 2019).

Com base na qualidade ou fisiopatologia, a dor é classificada em nociceptiva, nociplástica e neuropática (DESANTANA et al., 2020). Para conhecimento, a dor nociceptiva compreende a dor somática e visceral, e ocorre por estimulação química ou física direta a nociceptores (axônios de neurônios do sistema nervoso periférico especializados em detectar estímulos dolorosos e enviar essa informação ao sistema nervoso central). Assim, a dor nociceptiva é aquela relacionada à lesão real ou ameaça a um tecido não neural devida a ativação de nociceptores. A dor nociplástica é a dor que surge de uma nocicepção alterada, apesar de não haver evidência clara, ou ameaça, de lesão tecidual real provocando a ativação de nociceptores periféricos, ou evidência de doença ou lesão no sistema somatossensitivo que cause a dor. A dor neuropática, por sua vez, é consequência direta de uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensitivo, o sistema que transmite e processa informações táteis, proprioceptivas, nociceptivas, viscerais e térmicas de um indivíduo (DESANTANA et al., 2020; TREEDE et al., 2019; COLLOCA et al., 2017; NICKEL et al., 2012). Independentemente da sua classificação, a dor é a principal razão de procura pelo sistema de saúde e está entre as principais causas de incapacitação e absenteísmo ao trabalho (LANGLEY; RUIZ-IBAN, 2011; PICA-VET; SCHOUTEN, 2003). No Brasil, estima-se que a dor crônica atinja em torno de 22 a 40% da população adulta (LEOPOLDINO et al., 2016;

DEPINTOR et al., 2016; DELLAROZA et al., 2013). Neste trabalho será destacada a dor neuropática.

A dor neuropática ocorre devido a traumas mecânicos (secção ou constrição em nervo periférico, lesões no SNC), doenças metabólicas como diabetes, doenças nutricionais, alcoolismo, uso de fármacos, exposição a toxinas, neoplasias, lesões vasculares, entre outros (BARON; BINDER; WASNER, 2010). Na dor neuropática, o sistema nervoso responde inapropriadamente ao dano mediante múltiplos mecanismos que resultam em interpretações inadequadas dos impulsos sensoriais e sensações dolorosas espontâneas (MEACHAM et al., 2017; VAN HECKE et al., 2014).

Estima-se que a dor neuropática afeta entre 1,5 a 8% da população mundial, gerando custos significativos para os indivíduos acometidos por ela e aos sistemas de saúde (CHEN et al., 2019; COLLOCA et al., 2017; FINNERUP et al., 2015; VAN HECKE et al., 2014; HEHN; BARON; WOOLF, CLIFFORD, 2012). No Brasil, um estudo de coorte com 2118 pacientes com dor crônica revelou prevalência de dor neuropática em 14,5% dos pacientes (UDALL et al., 2019). É possível que a dor neuropática se torne ainda mais prevalente devido ao maior tempo de vida da população mundial, ao aumento da incidência de diabetes mellitus, e ao maior índice de sobrevivência após quimioterapias para tratamento de cânceres, uma vez que essas condições levam a quadros dolorosos neuropáticos (COLLOCA et al., 2017). Além de redução significativa na qualidade de vida das pessoas acometidas por dor neuropática, frequentemente esse tipo de dor está associada à ansiedade, depressão e distúrbios de sono (COLLOCA et al., 2017; ZHAO et al., 2017; FINNERUP et al., 2015; DWORKIN et al., 2007). É comum aos pacientes que experienciam dor neuropática alterações sensoriais como alodinia (dor frente a um estímulo inócuo) e hiperalgesia (resposta exacerbada frente a um estímulo nocivo) (DAS, 2015), as quais caracterizam o quadro chamado sensibilização (aumento na responsividade de neurônios à estimulação normal ou recrutamento de uma resposta a estímulos normalmente sublimiáveis). A sensibilização ocorre na periferia (sensibilização periférica) e no SNC (sensibilização central). A sensibilização central parece ser um fenômeno chave na fisiopatologia da dor neuropática (COLLOCA et al., 2017).

Os mecanismos envolvidos na sensibilização são complexos, multifatoriais e evoluem ao longo do tempo (PASERO, 2004), tornando a dor neuropática complexa e de difícil tratamento. O entendimento incompleto da fisiopatologia da dor neuropática limita as alternativas terapêuticas para esse tipo de dor (GEIS et al., 2017; MEACHAM et al., 2017). A principal abordagem utilizada atualmente no tratamento da dor neuropática é a farmacológica, onde se destacam os fármacos gabapentina e pregabalina, opióides e antidepressivos

tricíclicos (COLLOCA et al., 2017; FINNERUP et al., 2015). No entanto, os tratamentos com esses fármacos são inespecíficos, com eficácia limitada e associados a efeitos adversos variados, como sedação, sonolência, taquicardia, náusea, retenção urinária e ganho de peso. Apenas 30 a 50% dos pacientes relatam alívio satisfatório da dor com o uso de um ou de uma combinação desses fármacos (COLLOCA et al., 2017; MAGRINELLI; ZANETTE; TAMBURIN, 2013; DWORKIN et al., 2007). Portanto, torna-se necessário ampliar as possibilidades terapêuticas para dor neuropática, com o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos.

1.2 USO DE MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DA DOR NEUROPÁTICA

Embora os seres humanos possuam a capacidade de verbalização do fenômeno doloroso, os estudos de dor em humanos permitem apenas uma abordagem limitada. Os modelos animais, especialmente roedores, são os mais utilizados na busca de avanços no entendimento dos mecanismos patofisiológicos e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a dor neuropática (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Apesar de não possuírem capacidade de verbalizar sua percepção do estímulo doloroso, os animais exibem respostas motoras similares às dos humanos quando em contato com estímulos nociceptivos, as quais permitem inferir a existência de nocicepção (KAVALIERS, 1988; DUBNER, 1983).

Dentre os modelos de dor neuropática, o modelo de constrição crônica no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), desenvolvido por BENNETT & XIE (1988), é um dos mais utilizados por simular situações clínicas comuns aos humanos, como causalgia ou síndrome da dor complexa regional (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Neste modelo, quatro amarraduras com fio de sutura bioabsorvível são colocadas no tronco comum do nervo isquiático (Figura 1), de modo que um segmento de aproximadamente 7 mm desse nervo fica lesionado pelo estrangulamento e pela posterior reação inflamatória local. Isso provoca dor neuropática, que se caracteriza por dor espontânea, dor evocada, e hiperalgesia e alodinia, condições normalmente observadas em humanos com dor neuropática (KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013; KLUSÁKOVA; DUBOVÝ, 2009). A hiperalgesia e a alodinia podem ser avaliadas por testes simples de sensibilidade dolorosa normalmente aplicados a roedores (KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013; KLUSÁKOVA; DUBOVÝ, 2009; KAVALIERS, 1988; DUBNER, 1983).

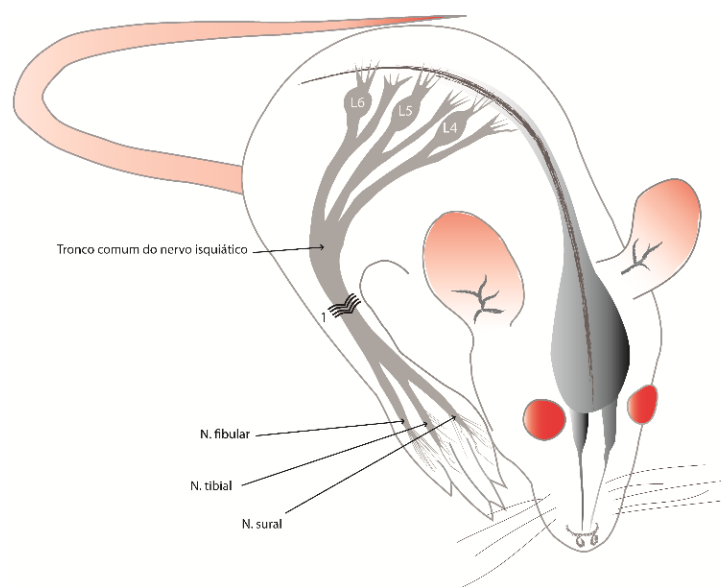


Figura 1: Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinal lombar, ilustrando a formação do nervo isquiático. Nas raízes dorsais do nervo isquiático estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5, L6) desse nervo, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente se divide também no nervo sural, e o fibular. No tronco comum do nervo isquiático estão mostradas as quatro amarraduras que promovem a constrição nesse nervo (Elaborado pela autora).

No modelo de CCI foi observado que a compressão nervosa associada à amarradura leva a um quadro de degeneração Walleriana, edema intraneural, isquemia focal e lesão inflamatória epineural (KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013; JAGGI et al., 2011). A cascata neuroinflamatória que se desenvolve é caracterizada por infiltração de leucócitos, ativação de células gliais e liberação de mediadores químicos com ação pró-inflamatória no local da lesão (FERNANDES et al., 2018). Porém, as mudanças não se limitam apenas à periferia, mas também se estendem às regiões do SNC envolvidas no processamento de informação dolorosa (FERNANDES et al., 2018; KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013; KLUSÁKOVA; DUBOVÝ, 2009). A alodinia e a hiperalgesia, assim como acréscimo em marcadores de inflamação, são observados já na primeira semana após a CCI e persistem por, no mínimo, sete (07) semanas após a cirurgia (JAGGI et al., 2011).

O modelo CCI tem sido muito usado em pesquisas sobre dor espontânea e anormalidades que caracterizam a dor neuropática (JAGGI et al., 2011). Segundo esses autores, o modelo é muito útil para as análises de sintomas sensoriais associados com a

síndrome do encarceramento ou da compressão de nervos cutâneos. Por se caracterizar por amarraduras no nervo, o modelo CCI pode apresentar variações nas respostas fisiopatológicas devido ao grau de variação na intensidade da amarradura, o que traz alguma dificuldade na comparação dos resultados de diferentes estudos onde se utiliza o modelo (JAGGI et al., 2011). Segundo esses autores, outros fatores que provocam variações nas respostas são tipo de material usado na amarradura e linhagem do animal usado na pesquisa. Porém, os autores salientam que o modelo CCI tem proporcionado a abertura de novas linhas de pesquisa sobre os mecanismos envolvidos em todas as formas de dor neuropática e na pesquisa de tratamentos mais eficazes para o manejo desse tipo de dor.

Em virtude da lesão nervosa, diversos mediadores químicos são produzidos localmente e atuam tanto no local da lesão como no SNC. Dentre os mediadores químicos, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). A liberação dessas espécies contribui para a hiperalgesia e a alodinia (GRACE et al., 2016; SALVEMINI et al., 2011). Para atender os propósitos desse estudo, será destacada a participação das ROS na dor neuropática.

1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SISTEMAS ANTIOXIDANTES: ALTERAÇÕES NA DOR NEUROPÁTICA

A formação de ROS ocorre em virtude dos processos do metabolismo energético celular. A fosforilação oxidativa mitocondrial e a atividade de enzimas pró-oxidantes, como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NADPH oxidases) são algumas das fontes endógenas usuais de geração de ROS (Figura 2). Como exemplos de ROS citam-se aqui o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (POLJSAK; SUPUT, MILISAV, 2013).

Por sua natureza altamente reativa, as ROS, quando em excesso, podem levar a quadros de estresse oxidativo (GRACE et al., 2016; SIES, 2015; KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013; POLJSAK et al., 2013). Por outro lado, em baixas concentrações, as ROS atuam benéficamente em diversas funções fisiológicas, como respostas mitogênicas, ativação de fatores de transcrição e regulação de vias de sinalização intracelular (PIZZINO et al., 2017; DROGE, 2002). De acordo com POLJSAK et al. (2013), um ambiente levemente pró-oxidativo é necessário para manter os processos de sinalização em condições ideais, o que sugere que as correções nas concentrações de ROS devem ser sutis.

A homeostase redox das células é cuidadosamente mantida por um elaborado sistema de defesas antioxidantes, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos (HUANG; LI, 2020; POLJSK et al., 2013). Os antioxidantes são moléculas que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável previnem a oxidação do substrato (SALMON et al., 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os antioxidantes possuem papel essencial na regulação da produção de ROS e na proteção do meio intracelular aos danos causados pelo excesso de ROS (PIZZINO et al., 2017; DROGE, 2002). Dentre as primeiras linhas de defesas antioxidantes enzimáticas, destaca-se a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . O H_2O_2 , por sua vez, pode ser eliminado pela catalase ou peroxidases (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FRIDOVICH, 1998) (Figura 2). Entre os antioxidantes não enzimáticos, destaca-se o ácido ascórbico, a glutatona e o alfa-tocoferol. A glutatona é um tripeptídeo capaz de reduzir e regenerar várias moléculas oxidadas, atuando também como um eficiente *scavenger* de ROS (HALLIWELL; SALMON et al., 2010; GUTTERIDGE, 2007). Os tióis totais, dentre os quais está a glutatona, são particularmente sensíveis às reações redox e são considerados sensores redox, os quais interagem com diferentes tipos de oxidantes para formar, em diversas situações, uma modificação covalente reversível que inclui a formação de pontes dissulfídicas, um dos principais mecanismos por meio do qual se pode controlar a função de proteínas (EATON, 2006; DROGE, 2002). Assim, um marcador importante de oxidação de proteínas é o conteúdo de tióis totais (TROMM et al., 2012).

Em condições de dor neuropática, diversos estudos mostram mudanças em antioxidantes e incrementos na formação de ROS, tanto no local da lesão como em regiões do SNC (KIM, H. Y. et al., 2015; HORST et al., 2014; SCHEID et al., 2013; GUEDES et al., 2008; NAIK et al., 2006). Destaque especial é dado ao envolvimento do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 no desenvolvimento da sensibilização associada à dor crônica (GRACE et al., 2016; KIM, H. Y. et al., 2015; SALVEMINI et al., 2011). O $O_2^{\bullet-}$ parece mediar a potencialização a longo prazo dos neurônios excitatórios do trato espinotalâmico (neurônios que retransmitem informações nociceptivas da medula espinal para o cérebro) e a depressão a longo prazo em interneurônios inibitórios GABAérgicos da medula espinal (BITTAR et al., 2017). O H_2O_2 parece aumentar a frequência dos potenciais de ação nos neurônios primários envolvidos na dor neuropática (SÖZBIR; NAZIROGLU, 2016). Outro parâmetro que sabidamente está alterado na dor neuropática são os tióis totais, reduzidos tanto no nervo quanto na medula espinal em condição de dor neuropática (BHAT et al., 2016; NAIK et al., 2006).

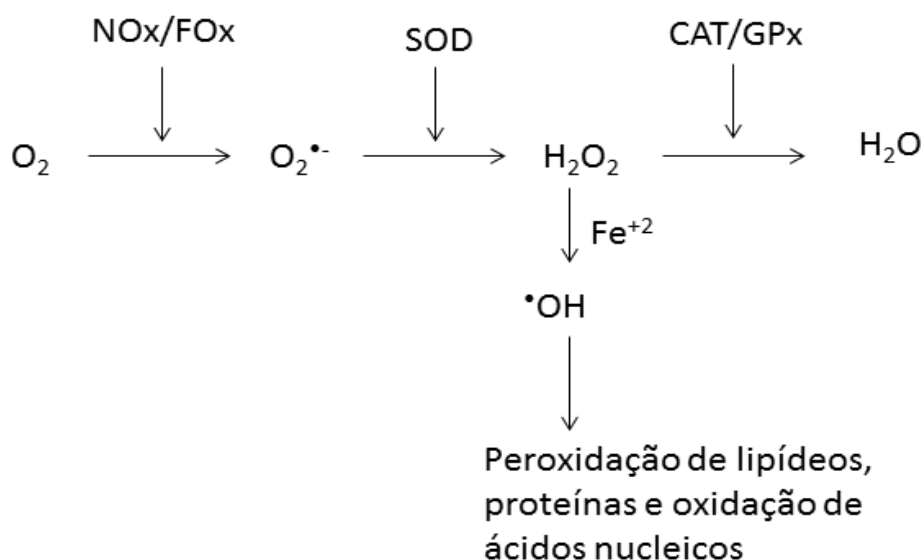


Figura 2: Redução do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O) pela ação de enzimas NADPH oxidases (NOx) e da fosforilação oxidativa (FOx). No esquema é mostrada a formação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e radical hidroxil (OH^{\bullet}), assim como a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Adaptado de Grace et al., 2016).

1.4 TERAPIA POR MANIPULAÇÃO QUIROPRÁTICA

A terapia de manipulação das articulações tem sido utilizada para tratar doenças humanas desde a antiguidade. Procedimentos de manipulação são evidentes na arte Thai, datando 4.000 anos. Constam ainda em antigos registros do Egito, da China, do Japão e do Tibete, e em relatos de Hipócrates e outros de sua época. Há pouco mais de um século, estes procedimentos manipulativos foram codificados dentro de um sistema e organizados como uma ciência por dois fundadores: David Daniel Palmer e Andrew Taylor Still, sendo denominados Quiropraxia e Osteopatia, respectivamente, por seus idealizadores (HOMOLA, 2006).

De acordo com a Federação Mundial de Quiropraxia, a quiropraxia é “uma profissão da saúde de nível superior envolvida no diagnóstico, tratamento e prevenção de distúrbios mecânicos do sistema musculoesquelético e o efeito destes distúrbios sobre a função do sistema nervoso e a saúde em geral, a qual se difere da medicina clássica pelo emprego de tratamento manual, que inclui manipulação ou ajustamento da coluna vertebral.” A

manipulação articular vertebral, praticada pelo quiropraxista, é realizada sobre uma determinada articulação que se encontra com restrição na sua amplitude normal de movimento, e é definida como um movimento passivo da articulação que vai além da amplitude normal de movimento da articulação. O seu resultado é o aumento da magnitude do movimento da articulação manipulada/ajustada, a redução de espasmos musculares na região tratada e a diminuição da dor musculoesquelética (BIALOSKY et al., 2009). Portanto, o objetivo clínico da quiropraxia é restaurar a mobilidade ideal da articulação e normalizar a fisiologia do sistema musculoesquelético e de outros sistemas envolvidos, como o sistema neural (PICKAR & BOLTON, 2012).

O uso da quiropraxia, com foco na prevenção e tratamento de alterações dolorosas no sistema musculoesquelético, tem crescido mundialmente nas últimas décadas. Diversos estudos têm sido realizados ao longo dos anos, sugerindo que a manipulação quiroprática é efetiva no tratamento de distúrbios musculoesqueléticos, como na dor lombar, na dor cervical, na síndrome do túnel do carpo e em osteoartrites que afetam o joelho e o quadril (RUBINSTEIN et al., 2019; ASPINALL et al., 2019; KOLBERG et al., 2012; PICKAR & BOLTON, 2012; KOLBERG et al., 2010; BIALOSKY et al., 2009). Enquanto estes estudos demonstram os benefícios clínicos decorrentes da manipulação quiroprática, os mecanismos e os efeitos fisiológicos que suportam estes benefícios não são completamente compreendidos.

A manipulação quiroprática é frequentemente teorizada como uma forma de corrigir as lesões mecânicas que acometem as articulações do sistema musculoesquelético, tais como as subluxações vertebrais. As subluxações vertebrais são definidas como um complexo de alterações funcionais, estruturais ou patológicas, que acometem a articulação e que podem levar a um comprometimento na integridade neural, influenciando, tanto localmente quanto sistemicamente, a homeostase. Geralmente são decorrentes de trauma ou de alterações funcionais que acometem a coluna vertebral, como as alterações posturais e perda da mobilidade articular, e seus sinais e sintomas são a presença de alterações no tônus da musculatura paravertebral, presença de dor ou pontos de gatilhos durante a palpação da região em análise, e restrição na amplitude normal de movimento da articulação (OWENS, 2002).

Inicialmente foi proposto que os efeitos benéficos associados à manipulação vertebral resultariam somente dos deslocamentos articulares consecutivos às manobras de manipulação vertebral. Assim, a manipulação produziria um efeito mecânico na articulação da coluna que geraria um deslocamento vertebral na ordem de 0,5-2 mm e, como resultado, geraria a melhora do quadro algico do paciente (CORONADO et al., 2012; PICKAR & BOLTON, 2012; GEORGE et al., 2006). Atualmente, se especula que a efetividade da manipulação

quioprática no tratamento das dores musculoesqueléticas pode estar associada a estes efeitos biomecânicos, mas também a efeitos no sistema nervoso que influenciam no relaxamento da musculatura, propriocepção e controle motor (FRYER & PEARCE, 2012). Algumas das alterações funcionais, como perda da mobilidade articular a longo prazo, podem resultar em sinais aferentes alterados ao SNC. Assim, é pertinente pensar que uma força mecânica proveniente da manipulação articular vertebral iniciaria uma cascata de respostas neurofisiológicas da periferia para o SNC, cujo sinal convergiria em direção às células do corno dorsal da medula espinal, modulando a transmissão da resposta nociceptiva centralmente. Logo, a manipulação quioprática normalizaria a biomecânica da articulação e, como consequência, normalizaria os estímulos alterados, provenientes dos aferentes articulares ao SNC, restabelecendo a função neurológica e melhorando os sintomas dolorosos (RUBINSTEIN et al., 2019; ASPINALL et al., 2019; BOLTON & PICKAR, 2012; HENDERSON, 2012; BIALOSKY et al., 2009; GEORGE et al., 2006). Essa cascata de respostas é sugerida atualmente como responsável pelos resultados observados na clínica, embora os mecanismos intrínsecos que acompanham essa cascata são ainda pouco conhecidos.

Ainda que outras profissões utilizem a manipulação como forma de tratamento, a manipulação ou ajustamento articular utilizado na quiropraxia tem como característica principal a manobra de alta velocidade e de baixa amplitude com uma linha de correção articular bem definida. Portanto, durante a manipulação quioprática, o quiropraxista deve controlar 3 fatores: a velocidade, a magnitude e a direção do impulso em uma região específica da coluna vertebral ou em outra articulação corporal (PICKAR & KANG, 2006).

Embora a manipulação quioprática seja a principal forma de tratamento utilizada pelos quiropraxistas (PICKAR & KANG, 2006), estes profissionais podem ainda utilizar outras formas de tratamento na prática clínica, como técnicas que envolvem o uso de instrumentos manualmente operados que, quando acionados, disparam uma força mecânica com força e magnitude controladas. Um exemplo desses é o *Impulse Adjusting Instrument* (*Impulse*®) (LIEBSCHNER et al., 2014). Esse instrumento é um dispositivo eletromecânico de ondas de choque de alta velocidade e baixa amplitude usado por quiropraxistas no tratamento de distúrbios musculoesqueléticos (NEFF & OKAMOTO, 2017; KELLER et al., 2006; COLLOCA et al., 2005). O dispositivo produz uma força de amplitude e pico controladas, que variam de 132,5 a 380,2 N dependendo de sua configuração de força (I, baixo; II, médio; III, alto) (KELLER et al., 2006; COLLOCA et al., 2005).

Os estudos clínicos e pré-clínicos usando ajustes quiropráticos instrumentalmente assistidos observaram melhora na dor e em resultados da função em distúrbios de dor relacionados à coluna vertebral (CONESA-BUENDÍA et al., 2020; NEFF & OKAMOTO, 2017). Observou-se ainda melhora na hiperalgesia mecânica secundária em ratos (DUARTE et al., 2019). Em um modelo animal de dor neuropática por compressão crônica em gânglios da raiz dorsal (DRG, do inglês *dorsal root ganglia*), o ajuste quiroprático assistido por instrumento provocou redução na interleucina (IL) do tipo 1beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α) em neurônios do DRG e da medula espinal (SONG et al., 2016). Porém, os mecanismos subjacentes à manipulação quiroprática ainda precisam ser mais bem elucidados. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar se o ajuste quiroprático assistido por *Impulse*® (AQAI) atenua os sintomas de dor neuropática e modula marcadores de estresse oxidativo em medula espinal e nervo isquiático de ratos com CCI, pois compreender essa relação proporcionará uma visão mais ampla sobre os mecanismos que contribuem para os benefícios da quiropraxia e o manejo de dor neuropática.

2. HIPÓTESE

O ajuste quiroprático assistido por *Impulse*® (AQAI) aumenta o limiar mecânico e a latência de retirada da pata a estímulo térmico e, paralelamente, provoca alterações no quadro oxidativo no nervo isquiático e na medula espinal, as quais são em direção oposta àquela induzida pela CCI.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo se propôs a avaliar o efeito do ajuste quiroprático assistido por *Impulse*® (AQAI) sobre nocicepção e atividade de marcadores de estresse oxidativo em nervo isquiático e medula espinal de ratos com dor neuropática induzida por CCI.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar o valor do pico de força do *Impulse*® nos seus 3 níveis de força.

3.2.2 Determinar o efeito do ajuste quiroprático com *Impulse*® sobre a nocicepção em ratos sem e com CCI no nervo isquiático direito, mediante avaliação do limiar mecânico e da latência de retirada da pata a estímulo térmico.

3.2.3 Determinar o efeito do ajuste quiroprático com *Impulse*® sobre a atividade de parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático e medula espinal de ratos sem e com CCI no nervo isquiático direito, mediante análises de pró-oxidantes (geração de ânion superóxido e valores de H₂O₂ e hidroperóxidos lípidos) e antioxidantes (capacidade antioxidante total e conteúdo de tióis totais).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS: PROCEDÊNCIA E MANUTENÇÃO

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (#32773, ANEXO I), foram solicitados ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) dessa Universidade 36 ratos da linhagem Wistar, machos, com idade 3 meses e peso corporal 180-250 g. Os animais foram mantidos no ratário do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, acomodados em caixas criadouros forradas com maravalha, com livre acesso à água e alimentação, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acessas das 07h00min às 19h00min) e temperatura ambiente de 22 ± 2 °C. A limpeza das caixas foi realizada, no máximo, a cada dois dias. O transporte dos animais para o Laboratório de Neurobiologia Comparada ocorreu nos dias dos testes, da cirurgia e/ou morte. Os ratos foram aclimatados por no mínimo uma semana antes de se dar início ao estudo.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos nos grupos experimentais descritos a seguir:

- Grupo controle: ratos que não sofreram manipulação cirúrgica (n=12 ratos);
- Grupo sham: ratos que foram submetidos à incisão cutânea e subcutânea longitudinal na pata posterior direita para isolamento e manipulação do nervo isquiático, sem receber qualquer constrição nesse nervo (n=12 ratos);
- Grupo CCI: ratos que foram submetidos à incisão cutânea e subcutânea longitudinal na pata posterior direita para isolamento do nervo isquiático, e recebeu nesse nervo 4 amarraduras em seu tronco comum (n=12 ratos).

Os animais destes grupos experimentais foram divididos em subgrupos (n= 6 ratos/subgrupo) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse*® (AQAI). Todos os ratos foram mantidos nas condições descritas no item anterior.

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação ao final de duas semanas para a obtenção do nervo isquiático direito e do segmento lombossacral da medula espinal.

4.3 CONSTRIÇÃO NO NERVO ISQUIÁTICO

O procedimento de constrição no nervo isquiático foi realizado segundo a técnica descrita por BENNETT & XIE (1988), com algumas modificações (RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018; RIFFEL et al., 2016; HORST et al., 2014). De forma resumida, os ratos foram inicialmente anestesiados com solução mista de quetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal), administrada por via intraperitoneal. Após anestesia, o rato foi posicionado em decúbito dorsal para a realização da tricotomia em sua coxa direita (Figura 3A). A intervenção foi iniciada pela assepsia da pele com álcool iodado 2%, seguida de incisão cutânea e subcutânea longitudinal na região do terço médio da coxa (Figura 3B, C). Nos ratos do grupo sham, o nervo isquiático foi apenas visualizado e manipulado (Figura 3D). Nos animais do grupo CCI, o nervo isquiático recebeu 4 amarraduras com fio de sutura *catgut* cromado 4.0 tipo c bioabsorvível (Shalon) em seu tronco comum, sendo a distância entre os nós cerca de 1 mm (Figura 3E, F). Assim, o comprimento do nervo afetado foi de aproximadamente 7,0 mm. O grau de constrição usado retarda, mas não interrompe totalmente a circulação sanguínea da superfície epineural.

Após a manipulação ou constrição no nervo isquiático, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível 4.0 (Somerville) e o antimicrobiano rifamicina (Rifocina Spray[®] 10 mg/mL, 1 jato) foi aplicado sobre a pele suturada (Figura 3G, H). Os animais do grupo controle não sofreram intervenção cirúrgica.

Ressalta-se que todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo pesquisador, para garantir o mesmo grau de constrição nos animais CCI e a padronização da manipulação nos ratos do grupo sham.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acomodados nas caixas com maravalha e mantidos em observação no Laboratório de Neurobiologia Comparada até a recuperação da anestesia. Neste período, os ratos receberam alimento e água *ad libitum*. Após a recuperação da anestesia, os animais receberam administração de aspirina por via oral na dosagem de 100 mg/kg de peso corporal. Em seguida, os ratos foram levados ao ratário, onde permaneceram até o dia da morte. Nesse período, os ratos não receberam nenhuma terapia analgésica para que os efeitos da lesão nervosa e tecidual não fossem mascarados por influências externas ao tratamento. Os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas no item 4.1 "Animais: Procedência e Manutenção". A mortalidade durante o estudo foi zero, ou seja, não correu perda de rato durante ou após o processo cirúrgico.

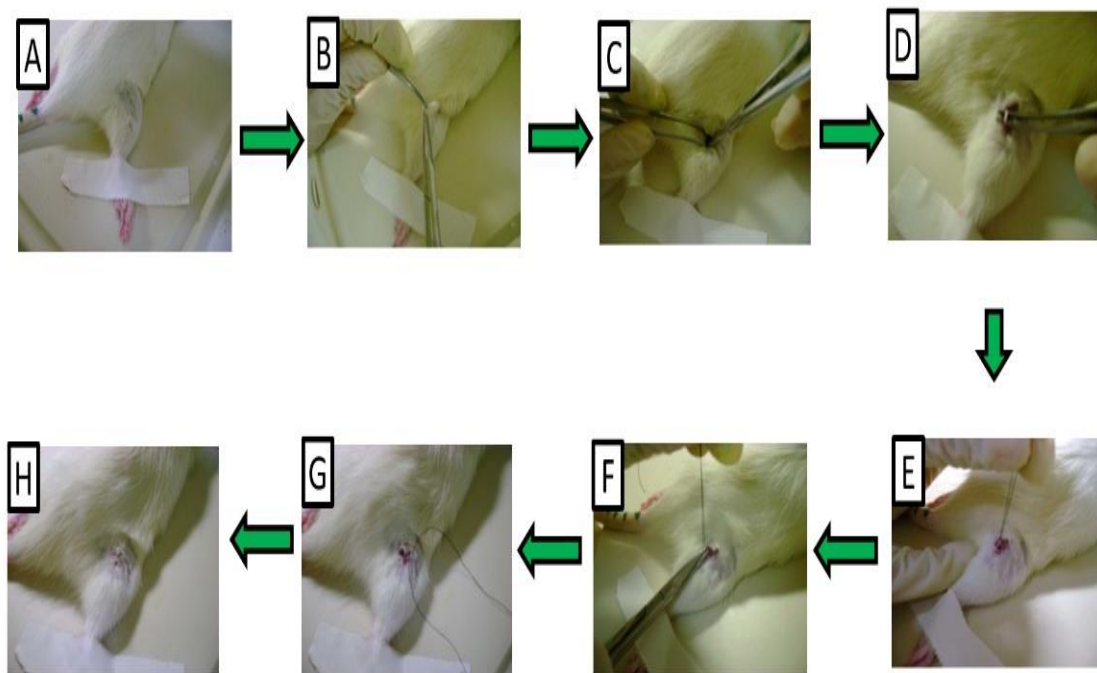


Figura 3: As fotografias mostram a sequência dos procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos. (A) Pata posterior direita de um rato em posição de decúbito dorsal mostrando a tricotomia na região média da coxa. (B) Início da incisão do tecido cutâneo na região média da coxa direita de um rato. (C) Processo de afastamento dos músculos bíceps femural e semitendinoso na região média da coxa direita de um rato. (D) Exposição do tronco comum do nervo isquiático na região média da coxa direita de um rato. (E) Realização do primeiro nó no tronco comum do nervo isquiático direito. (F) Realização do quarto nó no tronco comum do nervo isquiático direito. (G) Início da sutura do tecido cutâneo na região média da coxa direita de um rato. (H) Pata direita de um rato mostrando a sutura na região média da coxa (Elaborado pela autora).

4.4 APLICAÇÃO DO *IMPULSE*®

O ajuste quiroprático foi realizado com o instrumento de ajuste *Impulse*® (aprovação FDA nº K023462, Neuromechanical Innovations, Phoenix, Arizona, EUA). Para relembrar, o *Impulse*® é um instrumento quiroprático eletromecânico, manual, que gera pulsos rápidos de ondas de choque, sendo estes de baixa amplitude e duração quando comparado à manipulação vertebral manual (LIEBSCHNER et al., 2014; COLLOCA et al., 2005). Ele possui três configurações de força (I, baixo; II, médio; III, alto) e, assim, o pico de força varia de 132,5 a 380,2 N (COLLOCA et al., 2005). Segundo LIEBSCHNER et al. (2014), o *Impulse*® desenvolve onda de choque com largura de pulso de 4,08 ms, velocidade de 1,22 m/s, curso

do êmbolo de 1,24 mm, pico de força de 129 N com frequência de 126 Hz em sua configuração de força máxima.

Para o presente estudo, o *Impulse*® foi ajustado pelo fabricante para desenvolver um pico de força menor, adequado para estudos com roedores. Nenhuma outra alteração foi feita no instrumento *Impulse*® e, assim, ele manteve suas características externas e internas similares às usadas na clínica e aprovadas pelo FDA.

A intervenção quiroprática iniciou 72 horas após a cirurgia nos grupos que receberam essa terapia. Para a aplicação, o rato foi posicionado dorsalmente sobre uma plataforma rígida. O *Impulse*® foi aplicado sobre a região do processo espinhoso de L4-L5 (Figura 4). A aplicação foi realizada 3 vezes por semana, durante 2 semanas. O *Impulse*® foi usado sempre com nível de força III. Os ratos não foram anestesiados para a aplicação do *Impulse*®.

Os ratos que não receberam terapia com *Impulse*® permaneceram no ratário, nas mesmas condições descritas no item 4.1 "Animais: Procedência e Manutenção".

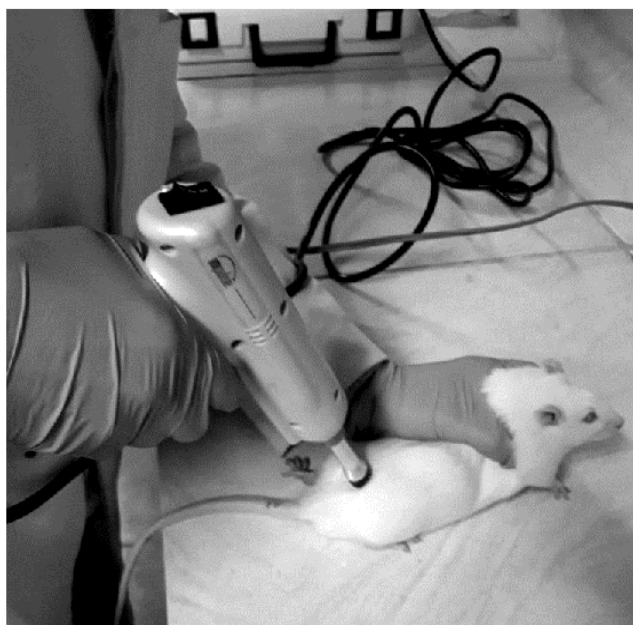


Figura 4: Aplicação de *IMPULSE*® sobre a região do processo espinhoso de L4-L5 de um rato (elaborado pela autora).

4.5 DETERMINAÇÃO DO VALOR DO PICO DE FORÇA E DE PRESSÃO DO *IMPULSE*®

Como o rato possui massa corporal aproximadamente 350 vezes menor do que a de um humano pesando 70 Kg (DUARTE et al., 2014), e o *Impulse*® é um instrumento para uso

clínico em humanos, o aparelho usado no presente estudo foi cordialmente ajustado pelo fabricante (Neuromechanical Innovations, Phoenix, Arizona, USA) para desenvolver uma força de menor valor como previamente informado. Para se estimar o valor da força aplicada aos ratos do estudo, usou-se uma célula de carga do tipo “S” com capacidade de 30 kgf, a qual foi fabricada pelo Grupo de Mecânica Aplicada (GMAp) do Departamento de Engenharia Mecânica, vinculado a Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para os testes, a célula de carga foi rigidamente montada sobre uma mesa e o *Impulse*® aplicado perpendicularmente sobre ela, por um quiropraxista, para a medida do pico de força resultante do impulso (*thrust*). Os dados da célula de carga foram repassados a um conversor analógico de 16-bits (USB1608HS2AO, *Measurement Computing*, MA, USA), que estava conectado a um conversor de sinais com 5 entradas (manufaturado pelo GMAp) que, por sua vez, estava conectado a um amplificador de corrente (Modelo TL074, Texas Instruments Inc., TX, USA), ligado a um computador. Os dados obtidos foram analisados mediante uso do software Agilent (UEE Pro 7.5, Agilent Technology, CA, USA). As determinações foram feitas com o *Impulse*® em cada um de seus níveis de força (I- baixo, II – médio, III, alto) e cada teste foi repetido por 5 vezes.

A partir dos dados de pico de força, os valores de pressão foram calculados mediante emprego da fórmula que segue: Pressão= valor do pico de força/área da ponteira do *Impulse*®.

4.6 PARÂMETROS NOCICEPTIVOS

4.6.1 Determinação do limiar mecânico

Para avaliar a sensibilidade mecânica se determinou o limiar de resposta da pata direita (ipsilateral à lesão nos ratos com lesão tecidual ou nervosa) mediante utilização do aparelho analgesímetro digital (Insight, Brasil), popularmente denominado teste de von Frey eletrônico.

Para a realização do teste, os ratos foram colocados individualmente em caixas de vidro (12 x 20 x 20 cm) apoiadas sobre uma superfície elevada e revestida por tela metálica. Neste ambiente, os animais foram aclimatados por 20 minutos. O teste consistiu na aplicação de forças crescentes na região plantar da pata posterior direita do animal (Figura 5). A resposta foi considerada positiva quando o rato realizou o movimento de retirada da pata

estimulada durante o teste. Neste momento, a intensidade da pressão exercida foi automaticamente registrada pelo aparelho. Porém, a resposta foi desconsiderada se seguida de caminhada. Neste caso, o teste foi refeito. O teste foi repetido cinco vezes, uma vez a cada 30 s, no mesmo animal e na pata ipsilateral à lesão. A média das cinco leituras foi considerada como o limiar de resposta do animal em experimentação. O teste foi realizado sempre pela mesma pessoa, em ambiente silencioso e ao início da manhã.

O teste foi realizado antes do procedimento cirúrgico (dia 0) e aos 4, 6, 8, 11, 13 e 15 dias pós-cirurgia. Os resultados do teste de limiar mecânico foram expressos como média \pm erro padrão da média das respostas antes e pós-lesão dos ratos nos períodos considerados.

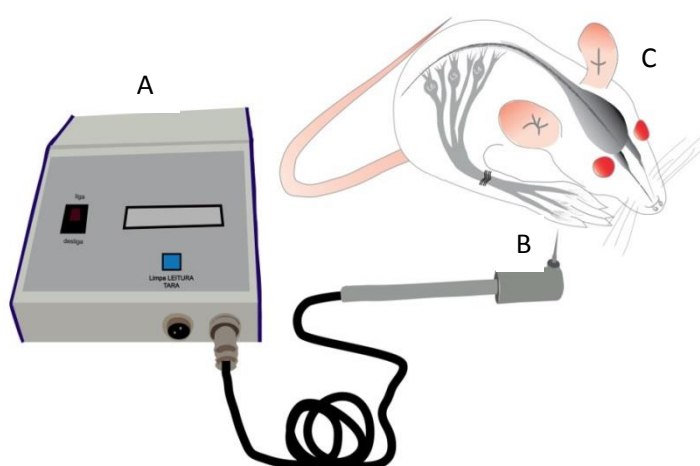


Figura 5: Aparelho analgesímetro digital (A) usado no teste de von Frey digital para determinar o limiar mecânico. O esquema mostra ainda a ponteira (B) usada para aplicar força à região plantar da pata direita de um rato com CCI (C). Para detalhes da CCI, consultar a Figura 1 (Elaborado pela autora).

4.6.2 Determinação da latência de retirada da pata a estímulo térmico

Para se determinar a latência de retirada da pata a estímulo térmico nos animais dos diferentes grupos experimentais, os mesmos foram submetidos ao teste da placa quente (Insight, Brasil). Para isto, os animais foram inicialmente aclimatados um por um, por um período de 20 minutos, à placa em temperatura ambiente. Após este procedimento, a placa foi aquecida e mantida à temperatura de 50 °C. Então, cada animal foi colocado sobre esta placa (Figura 6) e o tempo para o reflexo de retirada de uma das patas foi determinado e anotado. O rato foi retirado imediatamente do contato com a placa quente logo que manifestava a ação de erguer uma das patas, para não lesionar os tecidos com a alta temperatura.

Assim como foi feito no teste do limiar mecânico, a latência de retirada da pata foi realizada em ambiente silencioso, no início da manhã e pelo mesmo pesquisador. O teste da placa quente foi realizado antes do procedimento cirúrgico (dia 0) e no 4º e 15º dia pós-cirurgia. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média da latência de resposta dos ratos.

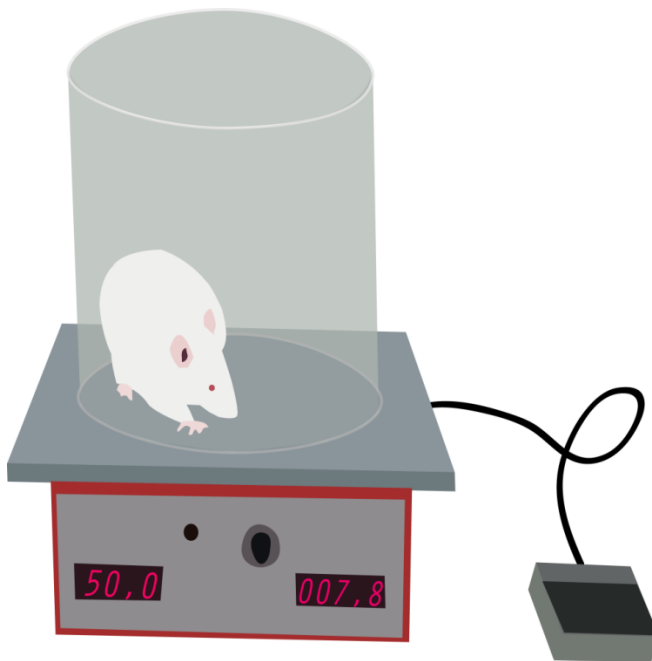


Figura 6: Esquema mostrando o aparelho usado no teste da placa quente. Note o rato sobre a placa quente, dentro do cilindro de contenção do animal. No esquema se pode ainda visualizar os marcadores de temperatura (50,0) e tempo (007,8), e o pedal de controle do aparelho (Elaborado pela autora).

Para facilitar o entendimento do leitor, a Figura 7 mostra a linha temporal da realização dos testes de sensibilidade dolorosa (testes de von Frey eletrônico e da placa quente). Na figura ainda é mostrado as datas da realização da cirurgia, o dia da morte dos ratos para a coleta dos tecidos usados nas determinações bioquímicas do estudo, e os dias de aplicação da intervenção quiroprática.

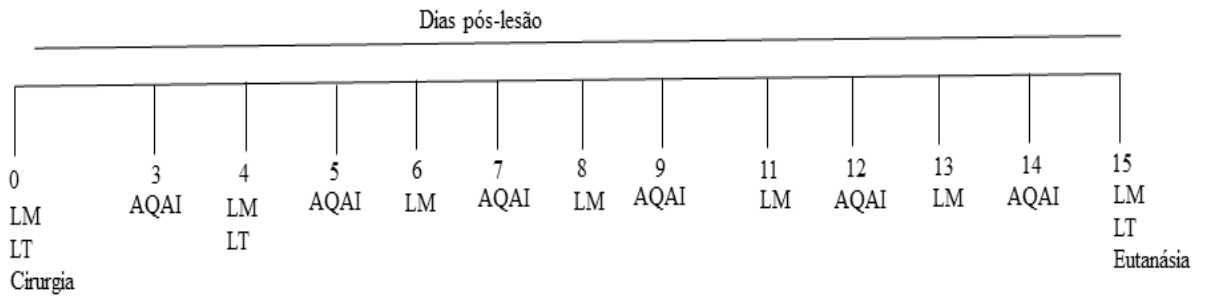


Figura 7 – Esquema temporal mostrando os dias das avaliações do limiar mecânico (LM) e da latência de retirada da pata a estímulo térmico (LT), da realização do procedimento cirúrgico, da eutanásia, e dos dias da terapia com ajuste quiroprático assistido por *Impulse*® (AQAI).

4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após o período experimental, os ratos foram mortos por decapitação. De cada rato foi coletado um segmento ($\pm 1,5$ cm) do nervo isquiático (nervo direito). Dos ratos CCI, o segmento coletado sempre se localizou acima do sítio de lesão. De cada rato ainda foi coletado o segmento lombossacral da medula espinal. A medula espinal foi dividida em três partes. Uma das partes foi utilizada para a determinação dos valores da formação de $O_2^{\bullet-}$. A segunda parte foi usada para a determinação dos valores de H_2O_2 . Essas duas partes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas intactas à temperatura de -80 °C. A terceira parte da medula espinal e o segmento do nervo isquiático foram homogeneizados e usados para a determinação da capacidade antioxidante total (TAC, do inglês *total antioxidant capacity*) e dos valores de hidroperóxidos lipídicos.

O homogeneizado da medula espinal foi ainda usado para determinar os valores de tióis totais. A homogeneização dos tecidos foi realizada em solução contendo cloreto de potássio (KCl) 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 100 mM, seguida de centrifugação a 1000 g, por 20 minutos, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C (RIFFEL et al, 2018).

4.8 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.8.1 Formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A formação de $O_2^{\bullet-}$ (SAG, do inglês *superoxide anion generation*) foi estimada pela redução de azul de nitrotetrazol (NBT), conforme técnica descrita por WANG et al. (1998). O método consistiu na reação de cortes de medula espinal com NBT, após incubação de 90 minutos, para formação de formazan, o indicador da formação do $O_2^{\bullet-}$. A absorvância do formazan foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A quantidade de formazan reduzido pelo $O_2^{\bullet-}$ foi calculada com o emprego da fórmula a seguir:

$$\text{Redução a formazan} = A \times V / (T \times Wt \times \epsilon \times l)$$

Na fórmula, o A representa a absorvância do formazan, V o volume de solução, T o período de incubação das amostras com NBT, Wt o peso do tecido, ϵ o coeficiente de extinção molar ($0,72 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$), e l representa o caminho óptico. Os resultados foram expressos em picomol por minuto por miligrama de peso do tecido.

4.8.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O ensaio para mensurar o H_2O_2 se baseou na oxidação do vermelho de fenol por H_2O_2 , mediado pela peroxidase de rabanete. O ensaio foi conduzido conforme técnica descrita por PICK & KEISARI (1980), com pequenas modificações (SCHEID et al., 2018). Para tanto, fatias finas de medula espinal foram incubadas em tampão dextrose-fosfato (5 mM; 10 mM, pH = 7,0), por 30 minutos, sob agitação. Após este período, o meio de incubação foi coletado e adicionado à solução contendo vermelho de fenol (0,28 mM) e peroxidase de rabanete (8,5 U/mL). Após 5 minutos de incubação, adicionou-se a mistura hidróxido de sódio (1,0 M) e se realizou a leitura da absorvância, em comprimento de onda de 610 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Os resultados foram expressos em micromols de peróxido por grama de tecido.

4.8.3 Hidroperóxidos lipídicos

O método do xilenol laranja (XO), descrito por JIANG et al. (1991) e adaptado por SÖDERGREN et al. (1998), se baseia na oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} na presença de lipoperóxidos, em pH ácido, formando complexos de Fe^{+3} xilenol laranja. Em solução ácida, o corante mostra pico a 560 nm e a absorvância cresce linearmente com o aumento da concentração do corante.

As amostras dos homogeneizados de medula espinal e nervo isquiático foram diluídas, em proporção de 1:10, e separadas em 2 grupos: no primeiro foi acrescentado metanol absoluto (MEOH), e no segundo, trifetilfosfina (TEP) 10 mmol/L. Ambos os grupos foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, foi pipetado, em microplaca, 10 μ L de amostra em quadruplicata (uma duplicata com o metanol, e outra duplicata com o TEP), adicionando-se em seguida 90 μ L do reagente de trabalho (RT-XO). Este consistiu em uma mistura de 81% de MEOH 90%, XO 2 mmol/L para concentração final de 100 μ M, H_2SO_4 1 mmol/L para concentração final de 25 mmol/L, BHT 40 mmol/L para concentração final de 4 mmol/L e sulfato ferroso amoniacal 10 mmol/L para concentração final de 250 μ mol/L.

A placa foi agitada por 30 minutos, em temperatura ambiente e, em seguida, se realizou a leitura em leitora de placas a 570 nm (Zenyth 200, BiochromInc, UK). Para os cálculos, foram descontados os valores de absorvância com TEP dos valores obtidos das duplicatas com MEOH. O resultado foi expresso em nmol por grama de tecido.

4.8.4 Capacidade antioxidante total

O método da TAC, adaptado de EREL (2004), consistiu no branqueamento da cor característica do reagente 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolona-6-sulfonato) ($ABTS^{*+}$) pelos antioxidantes presentes na amostra de homogeneizados de medula espinal e nervo isquiático. Esta reação foi monitorada espectrofotometricamente a 660 nm (aparelho Zenyth 200, BiochromInc, UK) e a taxa de branqueamento foi inversamente relacionada à TAC da amostra. A velocidade da reação foi calibrada com Trolox, que é largamente utilizado como um padrão para os ensaios de medição tradicional de capacidade antioxidante. Os resultados foram expressos em equivalentes de micromol de Trolox por grama de tecido. O ensaio tem uma excelente precisão, superior a 97%.

4.8.5 Tióis totais

A medida de tióis totais foi conduzida conforme descrito por AKSENOV & MARKESBERY (2001). Para tanto, a amostra de homogeneizado de medula espinal foi misturada a tampão PBS/EDTA (pH = 7,5) e a ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB, 10 mM). Após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 412 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A medida de TNB formado foi calculada conforme a fórmula:

$$\text{TNB} = (A_{412} - A_{412\text{sem proteína}} - A_{412\text{sem DTNB}}) / \Delta_{412\text{TNB}}, \text{ onde:}$$

$\Delta_{412\text{TNB}} = 14.150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, A_{412} é a absorbância da amostra; $A_{412\text{sem proteína}}$ é a absorbância do meio reacional sem amostra; $A_{412\text{sem DTNB}}$ é a absorbância do meio sem DTNB. Os resultados foram expressos em mmol por grama de tecido.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Previamente à realização do estudo se fez o cálculo do “n” (número mínimo de animais) utilizando o software WIN PEPI, versão 9.1. Este cálculo foi baseado em dados de estudos prévios (TRIERWEILER, 2012; SONG et al., 2006). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90%, desvio padrão assumido de 0,01. Assim, foi obtido número amostral 6 por grupo experimental. Nenhuma perda foi assumida para esse estudo.

As análises estatísticas foram realizadas usando SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL) para Windows. A distribuição gaussiana normal dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, enquanto o teste de Levene foi usado para analisar a homogeneidade da variância. Os resultados dos valores dos picos de força e pressão foram analisados pelo emprego de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de variação múltipla de Dunnet. Para a análise dos resultados dos testes nociceptivos e dos parâmetros oxidativos, a comparação dos resultados se deu mediante emprego do teste de ANOVA de duas vias (fatores: cirurgia e tratamento). Havendo diferença estatisticamente significativa, foi utilizado o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $P < 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média.

4.10 DISPOSIÇÃO FINAL DOS RESÍDUOS DA PESQUISA

4.10.1 Resíduos químicos

Os resíduos químicos foram acondicionados em embalagem adequada, previamente identificada, e encaminhados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de sua eliminação.

4.10.2 Resíduos biológicos

O lixo biológico, após acondicionamento correto e identificação, foi encaminhado ao CREAL do Instituto de Ciências Básicas da Saúde para sua devida eliminação.

5. RESULTADOS

Antes de se iniciar a descrição dos resultados experimentais, cabe destacar que o manuscrito referente a essa pesquisa foi aceito recentemente para publicação na *Pain Medicine*.

Citação do artigo: da Silva FBO, Santos MDCQ, Borella da Silva TC, Facchini D, Kolberg A, Barros RR, Silveira EMS, Kroth A, Duarte FCK, Vassoler JM, Kolberg C, Partata WA. Spine adjusting instrument (*Impulse*) attenuates nociception and modulates oxidative stress markers in the spinal cord and sciatic nerve of a rat model of neuropathic pain. *Pain Med.* 2021 May16;pnab167. doi: 10.1093/pm/pnab167. *Online ahead of print.*

5.1 Valores dos picos de força e de pressão

Os valores (média, desvio padrão) dos picos de força e de pressão do instrumento de ajuste quiroprático *Impulse*® adaptado pelo fabricante para uso em estudos pré-clínicos são mostrados na Tabela 1.

Observou-se aumento estatisticamente significativo dos valores de picos de força nos níveis II e III comparado a nível I (P=0,010 e 0,001, respectivamente). Uma diferença estatisticamente significativa também foi observada entre os valores dos picos de força dos níveis II e III (P=0,049).

A pressão aplicada pelo *Impulse*® nos níveis de força II e III também aumentou significativamente comparado ao valor obtido com o nível de força I (P<0,001 e 0,001, respectivamente). Porém, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os valores de pressão nos níveis II e III (P=0,051).

A diferença média e o intervalo de confiança 95% de todas as comparações são mostrados na Tabela 2.

Tabela 1: Valores dos picos de força e da pressão do instrumento de ajuste quiroprático *Impulse*® adaptado pelo fabricante para uso em estudos pré-clínicos em seus três níveis de força (I, II e III).

Nível I		Nível II		Nível III	
Pico de força	Pressão	Pico de força	Pressão	Pico de força	Pressão
20±0,26	45,4±0,6	22±1,50	50,0±3,4	23,5±0,20	53,4±0,6

Os valores dos picos de força e de pressão estão mostrados como média±desvio padrão dos valores em Newton (N) e Pascal (Pa), respectivamente.

Tabela 2. Diferença de média (MD) e intervalos de confiança (IC) dos picos de força e de pressão para as comparações entre os níveis de força (I, II e III) do instrumento de ajuste quiroprático *Impulse*® adaptado pelo fabricante para uso em estudos pré-clínicos.

Comparações	MD (IC)	MD (IC)	Valores de P
nível I vs nível II	(-2,00 [-3,403 a -0,596])	(-4,60 [-8,014 a -1,186])	0,010; <0,001
nível I vs nível III	(-3,50 [-4,903 a -2,097])	(-8,00 [-11,41 a -4,586])	<0,001; <0,001
nível II vs nível III	(-1,50 [-2,996 a -0,004])	(-3,40 [-6,814 a 0,013])	0,049; 0,051

As comparações específicas são mostradas na coluna à esquerda. Na coluna da direita estão os valores de P para as comparações de pico de força (valor superior) e de pressão (valor inferior). vs: versus.

5.2 PARÂMETROS NOCICEPTIVOS

5.2.1 Limiar mecânico

A comparação dos resultados de limiar mecânico mostrou efeito significativo da lesão ($F_{2,53}=79,884$, $P<0,001$) e da terapia ($F_{2,53}=7,196$, $P=0,001$), com interação estatisticamente significativa entre lesão e terapia ($F_{2,53}=3,020$, $P<0,001$). O pós-teste revelou que enquanto o limiar mecânico não sofreu alterações significativas para ratos controle ($54,322\pm 2,694$) e sham ($40,201\pm 9,988$) nos diferentes intervalos de tempo considerados no estudo (Figura 8A, B), este limiar diminuiu significativamente ($P<0,001$) nos ratos CCI sem intervenção quiroprática (Figura 8C). Nesses ratos, o limiar mecânico permaneceu reduzido em todos os intervalos de tempo avaliados [4 ($29,783\pm 2,287$), 6 ($32,383\pm 2,287$), 8 ($25,301\pm 2,230$), 11 ($24,962\pm 2,801$), 13 ($28,665\pm 2,505$), e 15 ($22,131\pm 2,800$)]. A terapia com ajuste quiroprático, por sua vez, atenuou a queda no limiar mecânico de ratos CCI, e esse efeito foi observado em todos os intervalos de tempo analisados [4 ($42,278\pm 2,505$), 6 ($38,983\pm 3,234$), 8 ($40,529\pm 2,800$), 11 ($43,822\pm 3,244$), 13 ($43,461\pm 2,287$), e 15 ($40,556\pm 3,230$)]. Portanto, o ajustamento quiroprático atenuou a redução no limiar mecânico por aproximadamente 53% comparado a ratos CCI que não receberam essa terapia.

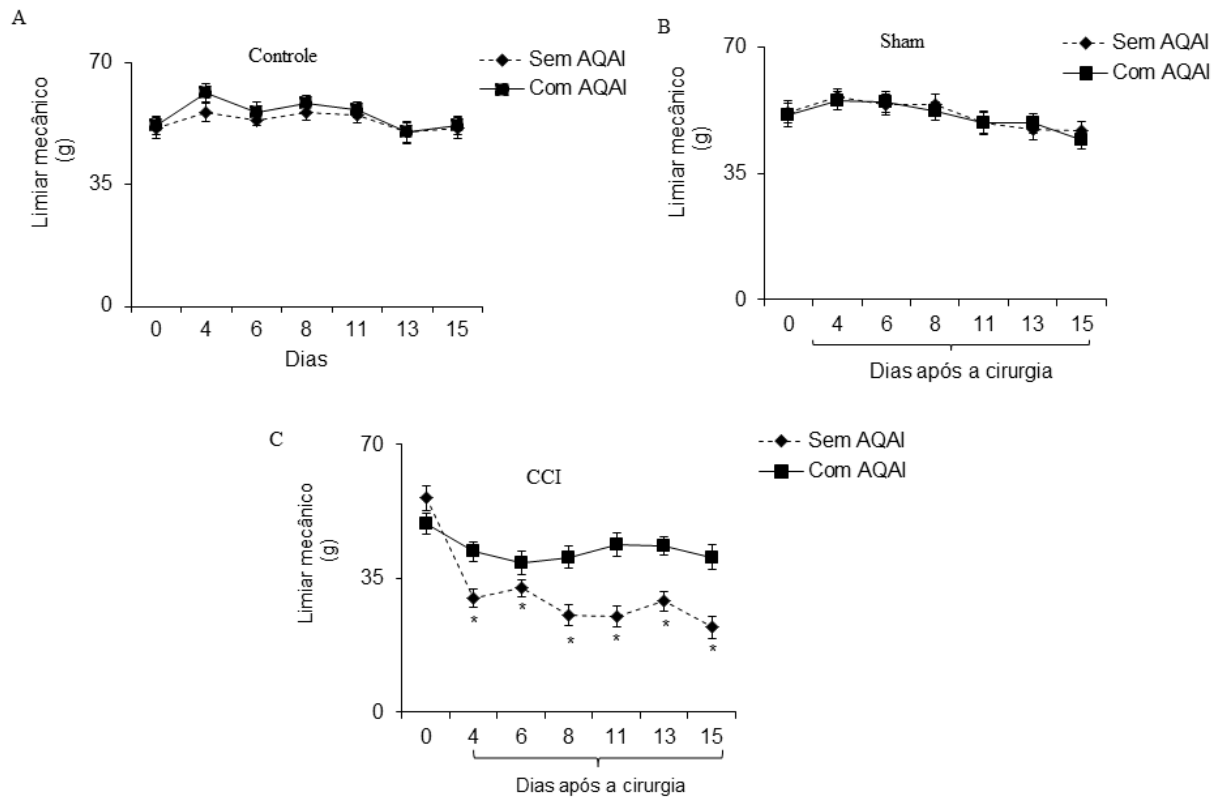


Figura 8: Medida do limiar mecânico em ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse*[®] (AQAI). Os dados são mostrados como média±erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). *P<0,05 comparado a ratos controle e sham (ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey). Controle: ratos sem cirurgia; Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição. O AQAI foi aplicado no processo espinhoso de L4-L5, 3 vezes por semana, por 2 semanas.

5.2.3 Latência de retirada da pata a estímulo térmico

A comparação dos resultados da latência de retirada da pata a estímulo térmico mostrou efeito significativo da lesão ($F_{2,53}=7,224$, $P < 0,001$), mas não da terapia ($F_{2,53}= 0,739$, $P=0,482$). Porém, observou-se interação estatisticamente significativa entre lesão e terapia ($F_{2,53}=2,925$, $P=0,005$). O pós-teste revelou que a latência de retirada não alterou significativamente em ratos controle ($27,202 \pm 2,740$) e sham ($25,214 \pm 2,689$) nos intervalos de tempo considerados no estudo (Figura 9A, B). Porém, a latência diminuiu significativamente nos ratos CCI (Figura 9C). No dia 4, os valores da latência de retirada da pata foram $13,567 \pm 2,201$ e $14,470 \pm 2,411$ nos ratos CCI sem e com AQAI, respectivamente. No dia 15, não se observou recuperação na latência de retirada da pata a estímulo térmico nos ratos CCI que não receberam terapia com ajuste quiroprático ($15,570 \pm 2,400$), mas a latência aumentou nos ratos CCI que receberam terapia ($21,500 \pm 2,411$) comparado aos valores pré-lesão. Portanto, o AQAI atenuou a queda no limiar térmico por aproximadamente 38% comparado a ratos CCI que não receberam terapia.

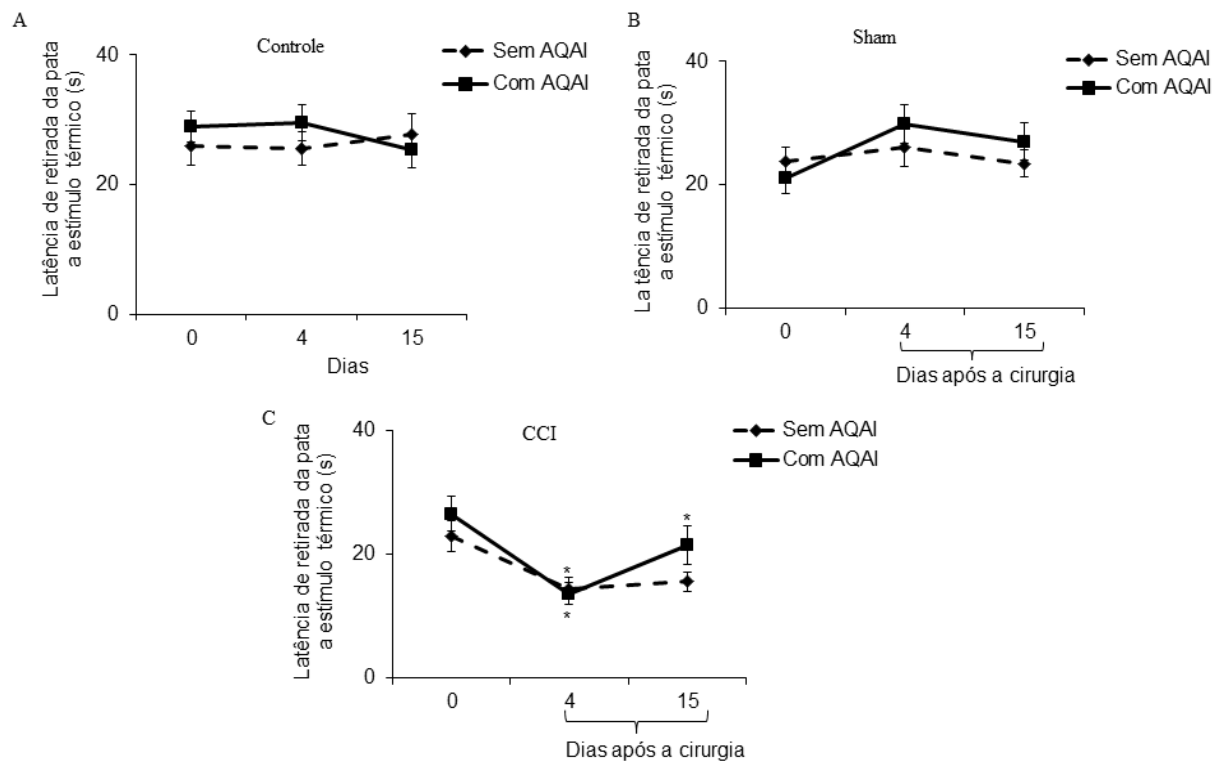


Figura 9: Medida da latência de retirada da pata a estímulo térmico em ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse®* (AQAI). Os dados são mostrados como média±erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). *P<0,05 comparado a ratos controle e sham (ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey). Controle: ratos sem cirurgia; Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição. O AQAI foi aplicado no processo espinhoso de L4-L5, 3 vezes por semana, por 2 semanas.

5.3 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO NERVO ISQUIÁTICO

A análise estatística mostrou que os valores de hidroperóxidos lipídicos no nervo isquiático não variou significativamente entre os grupos ($F_{2,53}=2,099$, $P=0,146$). Porém, uma diferença significativa foi encontrada entre terapia ($F_{2,53}=5,075$, $P=0,035$), com interação não significativa entre lesão e terapia ($F_{2,53}=1,914$, $P=0,171$). O pós-teste revelou que os valores de hidroperóxidos lipídicos aumentaram no nervo isquiático do grupo CCI sem terapia ($233,978 \pm 20,412$) comparado a ratos controle ($149,985 \pm 22,820$, $p=0,012$) e sham ($157,985 \pm 19,522$, $p=0,035$). Porém, este parâmetro não aumentou no nervo isquiático de ratos CCI que receberam terapia ($149,986 \pm 22,821$), sendo os valores similares àqueles encontrados em ratos controle ($P=0,888$) e sham ($P=0,979$) (Figura 10A).

Na TAC de nervo isquiático, a análise estatística mostrou efeito significativo da lesão ($F_{2,53}=807,677$, $P<0,001$), mas não da terapia ($F_{2,53}=0,483$, $P=0,497$), sem interação significativa entre lesão e terapia ($F_{2,53}=1,317$, $P=0,296$). O pós-teste revelou que a TAC aumentou no nervo isquiático do grupo CCI, tanto nos ratos sem terapia ($28,738 \pm 0,598$) como naqueles que receberam AQAI ($29,559 \pm 0,691$, $P<0,001$), comparado a ratos controle ($7,481 \pm 0,650$, $P<0,001$) e sham ($6,268 \pm 0,302$, $P<0,001$) (Figura 10B).

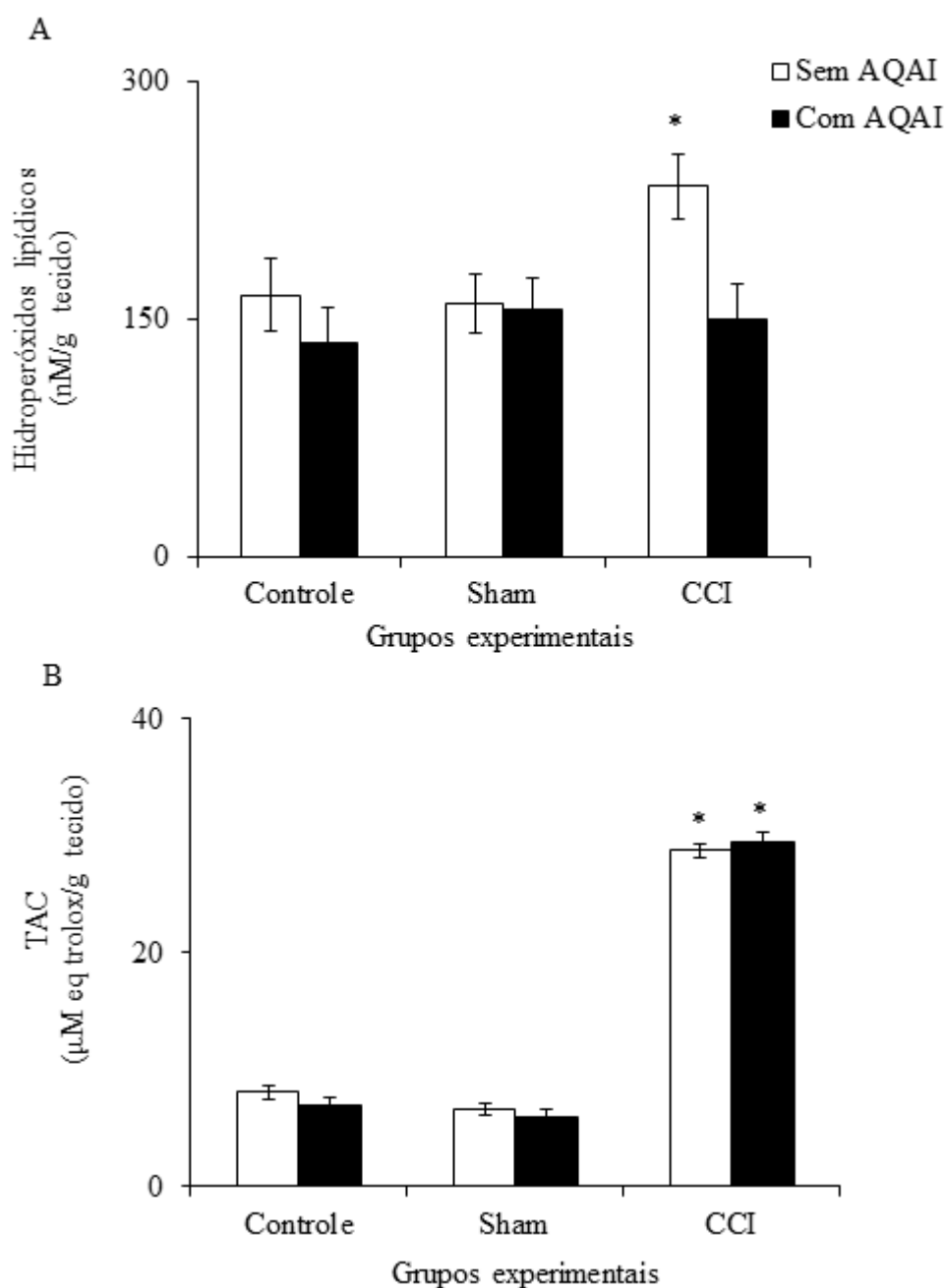


Figura 10: Valores de hidroperóxidos lipídicos (A) e capacidade antioxidante total (TAC) em nervo isquiático de ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quioprático assistido por *Impulse*® (AQAI). Os dados são mostrados como média±erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). *P<0,05 comparado a ratos controle e sham (ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey). Controle: ratos sem cirurgia; Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição. O AQAI foi aplicado no processo espinhoso de L4-L5, 3 vezes por semana, por 2 semanas.

5.4 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NA MEDULA ESPINAL

5.4.1 Pró-Oxidante

A comparação dos resultados de SAG na medula espinal mostrou efeito significativo da lesão ($F_{2,53}=30,667$, $P<0,001$) e da terapia ($F_{2,53}=13,147$, $P=0,002$), com interação estatisticamente significativa entre lesão e terapia ($F_{2,53}=13,807$, $P<0,001$). O pós-teste revelou que a SAG aumentou significativamente na medula espinal de ratos CCI sem manipulação quiroprática ($73,983\pm 3,200$, $P<0,001$) comparado a ratos controle ($37,991\pm 2,993$) e sham ($38,414\pm 3,180$). O acréscimo não foi observado na medula espinal de ratos CCI que receberam a terapia ($45,844\pm 3,200$) comparado a ratos controle ($P=0,155$) e sham ($P=0,484$) (Figura 11A).

A comparação dos resultados de H_2O_2 na medula espinal mostrou efeito significativo da lesão ($F_{2,53}=10,511$, $P<0,001$) e da terapia ($F_{2,53}=4,809$, $p=0,043$), com interação estatisticamente significativa entre lesão e terapia ($F_{2,53}=7,489$, $p=0,005$). O pós-teste revelou que os valores de H_2O_2 aumentou significativamente na medula espinal de ratos CCI sem terapia quiroprática ($2.500\pm 0,280$, $P<0,001$) comparado a ratos controle ($1,010\pm 0,300$) e sham ($1,150\pm 0,275$). O acréscimo não foi observado na medula espinal de ratos CCI que receberam a terapia ($1,800\pm 0,320$) comparado a ratos controle ($P=0,855$) e sham ($P=0,451$) (Figura 11B).

A análise estatística mostrou que os valores de hidroperóxidos lipídicos na medula espinal não variou significativamente entre os grupos ($F_{2,53}=3,299$, $P=0,056$). Porém, uma diferença significativa foi encontrada entre terapia ($F_{2,53}=16,201$, $P< 0,001$), com interação significativa entre lesão e terapia ($F_{2,53}=6,034$, $P=0,008$). O pós-teste revelou que os valores de hidroperóxidos lipídicos aumentaram significativamente na medula espinal do grupo CCI sem terapia ($202,481\pm 12,200$) comparado a ratos controle ($137,236\pm 11,456$, $P=0,06$) e sham ($134,987\pm 10,958$, $P=0,006$). Porém, este parâmetro não aumentou na medula espinal de ratos CCI que receberam terapia ($119,989\pm 10,820$), sendo os valores similares àqueles encontrados em ratos controle e sham (Figura 11C).

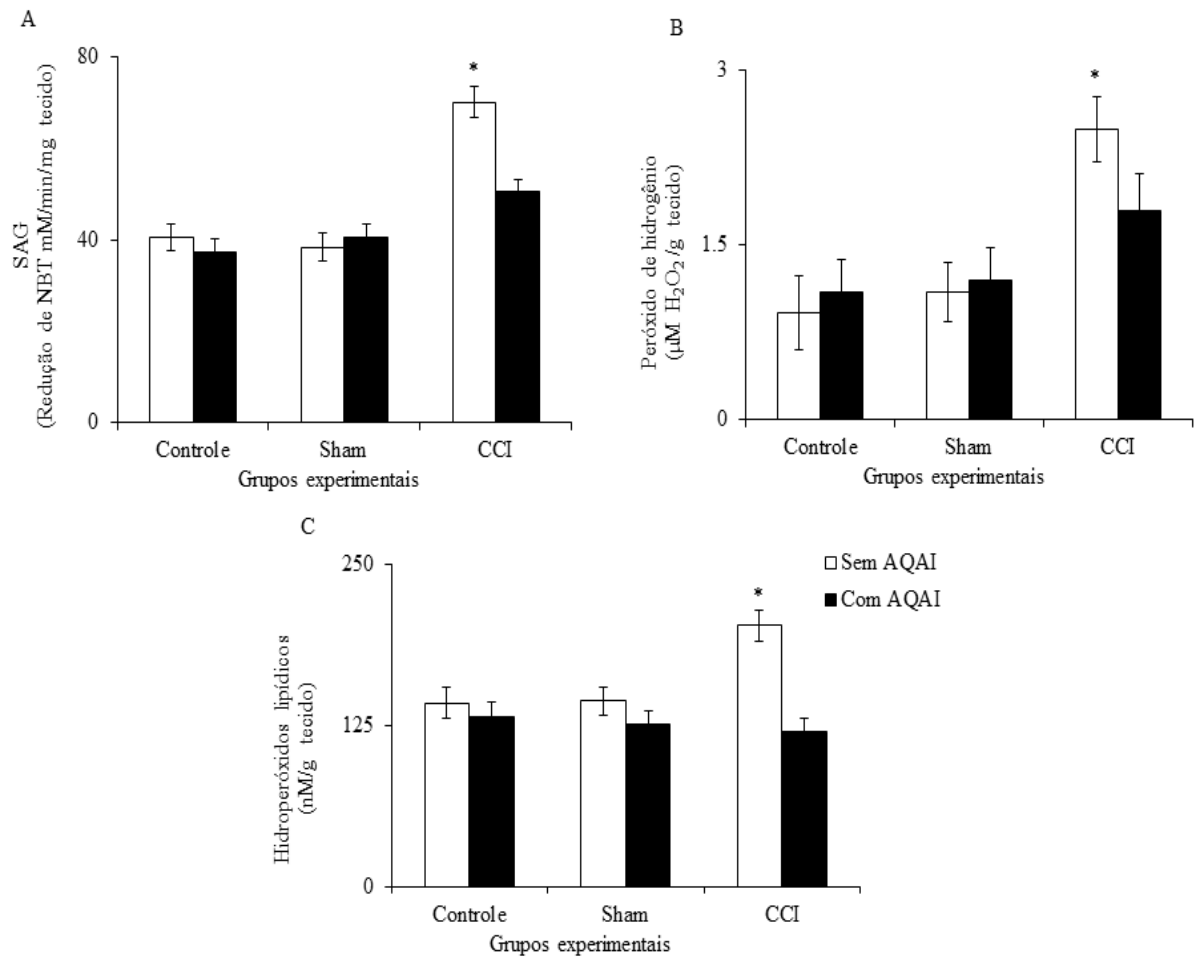


Figura 11: Valores da formação de ânion superóxido (SAG) (A), de peróxido de hidrogênio (B) e de hidroperóxidos lipídicos (C) na medula espinal de ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse*® (AQAI). Os dados são mostrados como média \pm erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). *P<0,05 comparado a ratos controle e sham (ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey). Controle: ratos sem cirurgia; Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição. O AQAI foi aplicado no processo espinhoso de L4-L5, 3 vezes por semana, por 2 semanas.

5.4.2 Antioxidante

Com relação à TAC na medula espinal, a análise estatística mostrou efeito significativo da lesão ($F_{2,53}=20,092$, $P<0,001$), mas não da terapia ($F_{2,53}=0,0586$, $P=0,810$). Não houve interação entre lesão e tratamento ($F_{2,53}=1,049$, $P=0,364$). O pós-teste revelou que a TAC aumentou significativamente na medula espinal de ratos CCI que não receberam AQAI ($33,413\pm 2,727$) e naqueles que receberam essa terapia ($37,134\pm 2,730$), comparado a ratos controle ($19,675\pm 2,857$, $p<0,015$ e $p<0,001$, respectivamente) e sham ($19,562\pm 3,340$, $p=0,008$ e $p=0,001$, respectivamente). Não houve diferença significativa entre os grupos CCI ($p=0,343$) (Figura 12A).

Na análise dos resultados do conteúdo de tióis totais da medula espinal, não se observou efeito da lesão entre os grupos ($F_{2,53}=1,442$, $P=0,262$). Também não houve efeito da terapia ($F_{2,53}=0,184$, $P=0,673$) nem interação entre lesão e terapia ($F_{2,53}=3,258$, $P=0,062$). Apesar de não ser significativo, a terapia quiroprática preveniu uma queda de 22% no conteúdo de tióis totais, redução observada na medula espinal de ratos sem terapia ($0,349\pm 0,023$) comparado a ratos CCI que receberam terapia ($0,454\pm 0,026$), ratos controle ($0,443\pm 0,027$) e ratos sham ($0,426\pm 0,031$) (Figura 12B).

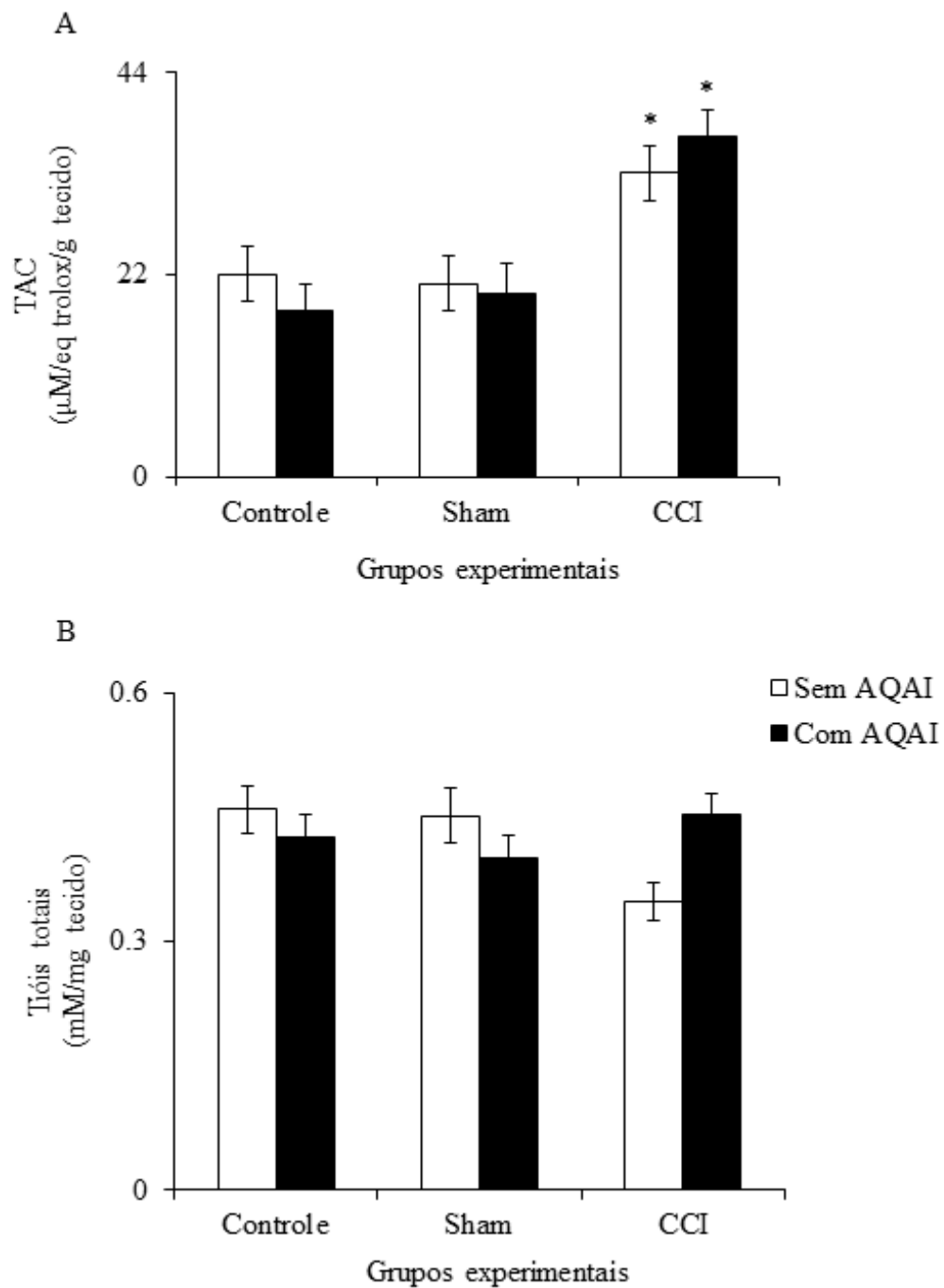


Figura 12: Capacidade antioxidante total (TAC) (A) e conteúdo de tióis totais (B) na medula espinal de ratos controle, sham e com constrição crônica no nervo isquiático (CCI) que receberam ou não ajuste quiroprático assistido por *Impulse*[®] (AQAI). Os dados são mostrados como média \pm erro padrão da média (n=6 ratos/grupo). * $P < 0,05$ comparado a ratos controle e sham (ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey). Controle: ratos sem cirurgia; Sham: ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto, porém sem constrição. O AQAI foi aplicado no processo espinhoso de L4-L5, 3 vezes por semana, por 2 semanas.

6. DISCUSSÃO

O modelo de dor neuropática por CCI é frequentemente empregado para se avaliar o potencial terapêutico de diferentes abordagens no manejo deste tipo de dor (EL GABBAS et al., 2019). O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que ajustamentos quiropráticos, realizados com instrumento, atenuam a queda induzida pela CCI no limiar mecânico e na latência de retirada da pata a estímulo térmico em ratos, resultados que são indicativos de efeito antinociceptivo promovido pela terapia. Em paralelo às alterações nas medidas nociceptivas, pela primeira vez se observou que esse tipo de intervenção quiroprática foi capaz de prevenir o aumento de hidroperóxidos lipídicos no nervo isquiático e na medula espinal, e o aumento da SAG e de peróxido de hidrogênio na medula espinal, mudanças essas encontradas nesses tecidos de ratos CCI sem terapia. O estudo ainda mostrou que a terapia não impede o acréscimo na TAC induzido pela CCI em nervo isquiático e medula espinal, e que tanto a CCI como a terapia de ajuste quiroprático não modificaram significativamente o conteúdo de tióis totais da medula espinal. Os resultados, em conjunto, apóiam a hipótese do nosso estudo, de que a manipulação quiroprática promove efeito antinociceptivo e modula parâmetros de estresse oxidativo no sistema nervoso periférico e central em ratos submetidos à dor neuropática por CCI. O uso de modelos animais vem crescendo na Quiropraxia e os resultados desses estudos, juntamente com os apresentados aqui, certamente possibilitarão um melhor entendimento dos mecanismos inerentes à Quiropraxia.

O ajuste quiroprático assistido por *Impulse*® e realizado no processo espinhoso de L4-L5, por 2 semanas, 3 vezes por semana, promoveu efeito protetor no limiar do reflexo de retirada da pata a estímulo mecânico em ratos submetidos à dor neuropática por CCI. Um efeito protetor similar foi observado em estudos anteriores com manipulação quiroprática aplicada na coluna vertebral lombar de rato com limiar mecânico alterado devido à dor induzida por diferentes condições, como hiperssensibilidade decorrente da imobilização de membro superior, de processo inflamatório no forame intervertebral, e dor neuropática induzida por compressão crônica no DRG (DUARTE et al., 2019; SONG et al., 2016; 2006). A diminuição no limiar mecânico, e da latência de retirada da pata a estímulo térmico em ratos CCI sem terapia está de acordo com dados da literatura (SCHEID et al., 2018; RIFFEL et al., 2018; 2016).

O teste de von Frey é usado principalmente para se avaliar o limiar mecânico em estudos clínicos e pré-clínicos de dor neuropática e, assim, é útil para se determinar a presença

de hiperalgesia cutânea ou alodinia (GREGORY et al., 2013). A CCI leva a manifestação de hiperalgesia secundária, característica principal da sensibilização central (CHEN et al., 2019). Este fenômeno no modelo de dor neuropática induzida por CCI é provocado por disparos neuronais anormais, tanto em nervo periférico como no DRG, o que leva a sensibilização em neurônios centrais da medula espinal e de áreas supraespinais. Como o limiar mecânico aumentou significativamente nos ratos CCI que receberam a terapia quiroprática, este resultado sugere atenuação na nocicepção e, conseqüentemente, modulação da função anormal do sistema somatossensorial. A dor neuropática, por definição, é aquela decorrente de lesão ou doença do sistema nervoso somatossensitivo ou somatossensorial (TREEDE et al., 2019; COLLOCA et al., 2017; NICKEL et al., 2012).

O teste da placa quente, que avalia sensibilidade térmica, mensura a latência para retirar ou lambe uma das patas em contato com a placa quente, ou seja, avalia a latência para o reflexo de retirada ou da lambida de uma das patas enquanto sobre a placa quente. É sugerido que a escolha de qual pata erguer para evitar o contato com a placa quente requer participação de regiões do SNC localizadas acima da medula espinal (GREGORY et al., 2013). Assim, o teste da placa quente não constitui um simples reflexo nocifensivo, mas requer uma integração em regiões superiores do neuroeixo (KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013). Como a latência de retirada da pata a estímulo térmico estava significativamente aumentada aos 15 dias nos ratos CCI que receberam AQAI, esses resultados sugerem efeito benéfico da terapia quiroprática, tanto em nível de medula espinal como de estruturas superiores do neuroeixo. Porém, o esclarecimento dessa questão exige a realização de estudos complementares sobre o efeito do AQAI sobre circuitos espinais e de regiões acima da medula espinal.

Os ratos com CCI constituem um dos principais modelos animais usado no estudo de dor neuropática periférica (KUMAR et al., 2018). No presente estudo, a terapia com ajuste quiroprático provocou atenuação na nocicepção em ratos com CCI. Esse resultado indica que a terapia pode ser uma boa opção no manejo de dor neuropática induzida por CCI. O efeito antinociceptivo da terapia também vem ao encontro dos resultados de estudos clínicos e pré-clínicos usando manipulação quiroprática assistida por instrumento no manejo de distintas condições de dor. Nesses estudos foram relatadas melhora na dor e em resultados da função em distúrbios de dor relacionados à coluna vertebral (CONESA-BUENDÍA et al., 2020; NEFF & OKAMOTO, 2017), e melhora na hiperalgesia mecânica secundária em ratos (DUARTE et al., 2019; SONG et al., 2016).

O presente estudo também avaliou ROS em nervo isquiático e segmento lombossacral da medula espinal, pois estresse oxidativo desempenha papel importante na patogênese de neuropatias, e danos induzidos por oxidantes, neuroinflamação e falha bioenergética contribuem para os déficits funcionais, comportamentais e bioquímicos em condições de dor (KOMIRISHETTY et al. , 2017; GRACE et al., 2016).

Em concordância com dados da literatura (RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018; HORST ET AL., 2017a; b; NAIK et al., 2006), os resultados do presente estudo mostraram acréscimo nos valores de hidroperóxidos lipídicos em nervo isquiático lesionado e segmento lombossacral da medula espinal de ratos CCI que não receberam terapia quiroprática e, ainda, aumentos na SAG e H_2O_2 na medula espinal desses ratos. Assim, pode-se sugerir que o modelo experimental de dor neuropática usado no presente estudo reproduziu as alterações características em parâmetros pró-oxidantes no tecido nervoso dos ratos CCI.

No modelo CCI se mostrou, pela primeira vez, que o AQAI, aplicado no processo espinhoso de L4-L5, por 2 semanas, 3 vezes por semana, foi capaz de prevenir as alterações nos marcadores pró-oxidantes, tanto em nervo isquiático lesionado como em medula espinal. É sabido que a deficiência na enzima NOX4, envolvida na formação de ROS, provoca diminuição na regulação para cima de citocinas pró-inflamatórias no local da lesão nervosa e uma atenuação na hiperssensibilidade mecânica induzida pela CCI (GEIS et al., 2017). O desenvolvimento de hiperalgesia mecânica parece relacionar-se com os valores de ânion superóxido e radicais hidroxil na medula espinal de camundongos com dor neuropática (BITTAR et al., 2017). Segundo esses autores, o ânion superóxido media potenciação de longa duração em neurônios excitatórios do trato espinotalâmico (neurônios que transmitem informação nociceptiva da medula espinal para o encéfalo) e depressão de longa duração em interneurônios inibitórios na medula espinal. O H_2O_2 parece aumentar a frequência de potenciais de ação em neurônios primários envolvidos na dor neuropática (SÖZBIR & NAZIROGLU, 2016). Como o efeito preventivo do AQAI sobre os valores de SAG e de H_2O_2 foram encontrados na medula espinal dos mesmos ratos que exibiram atenuação no limiar mecânico e na latência de retirada da pata a estímulo térmico, uma relação entre esses fatores não pode ser descartada. Um apoio a essa sugestão é o relato de atenuação no limiar mecânico em paralelo a uma diminuição nos valores de SAG em medula espinal de ratos com CCI (RIFFEL et al., 2018). Portanto, é plausível sugerir que a diminuição nos valores de SAG e de H_2O_2 da medula espinal pode estar contribuindo para o efeito antinociceptivo da terapia de ajuste quiroprático.

O acréscimo em marcadores pró-oxidantes, como ânion superóxido e H_2O_2 , pode estar relacionado com o aumento dos valores de hidroperóxidos lipídicos no nervo isquiático lesionado e na medula espinal dos ratos com CCI que não receberam terapia quiroprática. Os hidroperóxidos lipídicos são classificados como marcadores primários da peroxidação de lipídeos (DEXTER et al., 1994). O aumento em pró-oxidantes também pode estar relacionado com o acréscimo significativo na TAC do nervo isquiático lesionado e da medula espinal dos ratos CCI sem terapia. A TAC representa o estado geral dos antioxidantes do tecido (ZHANG et al., 2019). Os antioxidantes são moléculas que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável previnem a oxidação do substrato (HUANG; LI, 2020; SALMON et al., 2010). Os antioxidantes possuem papel essencial na regulação da produção de ROS e na proteção do meio intracelular aos danos causados pelo excesso de ROS (HUANG; LI, 2020; PIZZINO et al., 2017; DROGE, 2002).

Todavia, os valores da TAC permaneceram significativamente aumentados no nervo isquiático lesionado e na medula espinal dos ratos com CCI que receberam AQAI, muito embora tenha ocorrido nesses tecidos desses ratos uma diminuição estatisticamente significativa nos valores dos pró-oxidantes avaliados no presente estudo. Há diferentes técnicas para se avaliar a TAC. O ensaio de capacidade antioxidante medido por equivalentes de Trolox avalia principalmente albumina e ácido úrico, além de ácido ascórbico, α -tocoferol e bilirrubina (RUBIO et al., 2016). Os estudos clínicos e pré-clínicos com manipulação quiroprática observaram ao longo do curso da terapia aumento na atividade de antioxidantes enzimáticos, como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, em células sanguíneas vermelhas de pacientes com lombalgia e cervicalgia (KOLBERG et al., 2010, 2015). A manipulação quiroprática assistida por instrumento *Activator4* aumentou a atividade da glutathione peroxidase em células sanguíneas vermelhas de ratos com hiperssensibilidade à dor induzida por imobilização de membro posterior (DUARTE et al., 2019). Considerados em conjunto, os resultados sugerem que a terapia por manipulação/ajuste quiroprático aumenta a atividade de antioxidantes na circulação sistêmica. Todavia, o presente estudo observou aumento na TAC em tecido nervoso de um modelo de dor neuropática. Assim, não se pode excluir a possibilidade dos resultados das diferentes pesquisas se relacionarem ao tecido avaliado na pesquisa ou a presença de uma condição dolorosa. Ainda, o presente estudo avaliou a TAC mediante emprego de apenas uma técnica. Recomenda-se o emprego de diferentes ensaios para se medir a TAC em amostras biológicas (RUBIO et al., 2016). Deste modo, torna-se evidente a necessidade de realizar pesquisas complementares para entender

melhor a relação entre antioxidantes e terapia por manipulação quiroprática no contexto de diferentes condições de dor.

O conteúdo de tióis totais, por sua vez, não foi significativamente alterado na medula espinal de ratos CCI, independente dos mesmos terem ou não recebido terapia quiroprática. Os tióis desempenham papel importante na proteção da célula frente à pró-oxidantes (BINU et al., 2018). Eles são particularmente sensíveis às reações redox e são considerados sensores redox, os quais interagem com diferentes tipos de oxidantes para formar, em diversas situações, uma modificação covalente reversível que inclui a formação de pontes dissulfídicas, um dos principais mecanismos por meio do qual se pode controlar a função de proteínas (EATON, 2006; DROGE, 2002). A ausência de alterações estatisticamente significativas no conteúdo de tióis totais sugere que a terapia quiroprática previne a diminuição nesse parâmetro em medula espinal de ratos CCI. A redução no valor de tióis totais na medula espinal de ratos CCI sem terapia está de acordo com dados da literatura, os quais mostraram recuperação desse marcador de estresse oxidativo após terapias com antioxidantes (RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018). Desta forma, não se pode excluir a possibilidade da terapia quiroprática exercer efeito benéfico sobre os valores de tióis totais da medula espinal após dor neuropática induzida por CCI.

Embora os resultados do presente estudo mostrem o envolvimento de alterações em marcadores pró-oxidantes e antioxidantes em nervo isquiático e medula espinal adjacente à atenuação na hiperalgesia secundária após a terapia quiroprática, não se pode excluir a contribuição de outros fatores à resposta benéfica provocada por essa terapia. Em camundongo com dor neuropática por ligadura de nervo, outro modelo de dor neuropática, foi sugerido que a hiperalgesia mecânica envolveria a combinação de potenciação de longo prazo em neurônios espinotalâmicos excitatórios e depressão de longo prazo em interneurônios GABAérgicos inibitórios da medula espinal (BITTAR et al., 2017). Desta forma, é preciso considerar a possibilidade que o aumento do limiar mecânico após a terapia por AQAI se relaciona ao efeito dessa terapia sobre neurônios GABAérgicos da medula espinal. Porém, outros mecanismos neurais centrais também podem estar desempenhando papel na melhora da nocicepção em ratos CCI que receberam ajustamento quiroprático. Foi relatado que a mobilização articular (manipulação da articulação do joelho) produziu seus efeitos hipoalgésicos mediante ativação, na medula espinal, de receptores de monoaminas, e não pela ativação de sistema opióide ou GABAérgico em modelo de sensibilização central induzida por capsaïcina (SKYBA et al., 2003). A mobilização articular e a terapia por manipulação quiroprática possuem características mecânicas distintas, como valor de pico de força, pré-

carga e *thrust*, e, portanto, parecem atuar em sistemas diferentes. Enquanto a mobilização articular parece atuar em músculos axiais localizados mais superficialmente, a terapia por manipulação quiroprática parece estimular receptores situados em músculos intervertebrais profundos (BOLTON & BUDGELL, 2006). Contudo, a mobilização articular e a terapia por manipulação quiroprática podem compartilhar vias modulatórias comuns quanto ao seu efeito antinociceptivo. A aplicação de ajuste quiroprático único na vértebra lombar provocou supressão na atividade espontânea de neurônios nociceptivos do tálamo em ratos Wistar (REED et al., 2017). A terapia também provocou melhora em sintomas de dor neuropática mediante aumento na IL-10 em paralelo a quedas em fatores pró-inflamatórios e recuperação da excitabilidade em neurônios do DRG (SONG et al., 2016). A via IL-10/miR-155 parece desempenhar papel importante na regulação da NOX2, um indutor de formação de ROS, tanto extracelular como intracelular, em microglia/macrófagos (SABIRZHANOV et al., 2019). Como o presente estudo não avaliou a contribuição desses outros mecanismos na antinocicepção induzida pelo AQAI, mais pesquisas são necessárias para esclarecer a contribuição desses mecanismos no efeito benéfico do AQAI em ratos com dor neuropática induzida por CCI.

É sabido que em situações de estresse oxidativo ocorre ativação de uma variedade de fatores de transcrição, os quais ativam vários genes inflamatórios (HUSSAIN et al., 2016). Na neuropatia induzida por quimioterapia, observou-se que uma cascata complexa de eventos envolvendo a ativação de células endoteliais e infiltração de monócitos/macrófagos expressando receptor de quimiocina CX3CR1 ocorreu em nervo isquiático; essas alterações foram encontradas em paralelo a aumentos de ROS e sensibilização em neurônios sensoriais que expressaram canais TRPA1; em conjunto, as alterações se relacionaram com respostas de dor (MALCANGIO, 2019). A ativação de canais do tipo TRPA1 em células de Schwann parece gerar gradiente espacial local de ROS, o qual é importante para a infiltração de macrófagos no nervo isquiático lesionado e aumenta o tráfego de sinais parácrinos para ativar canais TRPA1 em nociceptores amielínicos e, dessa forma, sustentar a alodinia mecânica (De LOGU et al., 2017). Assim, o efeito benéfico do AQAI pode envolver uma interação complexa entre ROS e vários tipos de células (células imunes, células endoteliais e/ou células neurais), tanto na periferia quanto no SNC. A realização de estudos complementares é necessária para se avaliar o impacto do AQAI sobre esses mecanismos e seu papel na dor neuropática.

Contudo, o presente estudo possui algumas limitações. Primeiro: para as análises na medula espinal se usou todo o segmento lombossacral. Em condições de neuropatia unilateral

se observou, em medula espinal, diferenças na expressão gênica de opióides no lado ipsilateral e contralateral à lesão (KONONENKO et al., 2018). Assim, não se pode descartar a possibilidade das alterações nos marcadores de estresse oxidativo do lado ipsilateral à lesão ter sido diluída pelo lado contralateral da medula espinal. Segundo: como os resultados da TAC podem variar dependendo da técnica empregada (RUBIO et al., 2016), torna-se necessário avaliar esse parâmetro mediante uso de diferentes técnicas e, além disso, avaliar antioxidantes específicos. Terceiro: não foram avaliadas fontes de ROS. Um estudo mostrou que a NOX4, uma das fontes enzimáticas de ROS, possui participação em condições de dor neuropática, contribuindo para aumentos na formação de ROS e na desregulação na atividade de citocinas no local da lesão nervosa periférica (GEIS et al., 2017). Essa questão deve ser avaliada em estudos futuros sobre a relação entre ROS e terapia por manipulação/ajuste quiroprático. Quarto: embora o *Impulse*® tenha sido ajustado pelo fabricante para desenvolver pico de força menor (~20 N), a fim de melhor se adequar aos estudos pré-clínicos, o valor do pico de força do *Impulse*® ajustado não foi dimensionado ao peso corporal do rato. Considerando o peso corporal médio dos ratos do estudo (250 g) e o valor do pico de força aplicada ao mesmo, os ratos receberam uma força de intensidade aproximadamente 100 vezes maior do que seu peso corporal. Embora estudos anteriores tenham destacado a importância de se estabelecer o valor de pico de força adequado à massa corporal de um rato, a determinação dos parâmetros ideais, dos efeitos da complacência do tecido (rigidez) e da resposta à força de entrada (impedância), permanece ainda desconhecida em ratos (REED et al., 2017; 2013). Quinto: como o AQAI foi aplicado à área alvo usando a ponteira original do instrumento, é possível que a interface de contato do aparelho com a coluna vertebral do animal tenha sido grande, dado ao pequeno tamanho do roedor comparado a um humano. Mais estudos são necessários para esclarecer essa questão. Sexto: o presente estudo não analisou as características da onda de choque liberada pelo *Impulse*® ajustado. Embora as características da onda de choque do *Impulse*® tenham se mantido constantes em seus diferentes níveis de força e frente às alterações na resistência tecidual (LIEBSCHNER et al., 2014), não se pode excluir a possibilidade de mudanças no perfil da onda de choque no instrumento ajustado. O esclarecimento dessa questão exige a realização de estudos complementares sobre as características da onda de choque no *Impulse*® ajustado. Sétimo: os marcadores de estresse oxidativo foram avaliados apenas aos 15 dias após a aplicação do AQAI. Assim, torna-se necessário avaliar esses marcadores em períodos de tempo precoces e posteriores a 15 dias, para melhor compreensão dos efeitos temporais da terapia no tecido nervoso de ratos com CCI. Oitavo: o presente estudo não analisou tipos específicos de fibras

nervosas aferentes que poderiam ser ativadas pelo AQAI. É sabido que, na acupuntura, a intensidade, frequência, duração e intervalo entre estímulos influenciam diretamente no tipo de fibra nervosa aferente ativada; presença de excitação em fibras do tipo $A\beta$ (grupo II) e algumas do tipo $A\delta$ (grupo III) foi observada na analgesia induzida por eletroacupuntura (ZHAS, 2008). A estimulação de fibras $A\beta$ promoveu modulação em populações de neurônios excitatórios e inibitórios do corno dorsal superficial da medula espinal, o que levou à hipótese de que a estimulação dessas fibras em um segmento adjacente àquele onde se localiza a dor poderia melhorar a eficiência da analgesia (FAN, SDRULLA, 2020). Desta forma, é preciso considerar que a antinocicepção induzida pelo AQAI pode se relacionar com ativação de fibras nervosas aferentes, especialmente fibras do tipo $A\beta$ (grupo II), provenientes de diferentes locais e que convergem para o segmento da medula espinal analisado no presente estudo.

Apesar de suas limitações, os resultados do presente estudo são importantes por serem os primeiros a mostrar evidências do envolvimento de marcadores pró-oxidantes e antioxidantes do tecido nervoso no efeito benéfico da terapia quiroprática instrumentalmente assistida em ratos com dor neuropática induzida por CCI. Assim, os resultados do presente estudo contribuem, por um lado, para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos subjacentes à analgesia induzida pela terapia por manipulação/ajuste quiroprático e, por outro lado, reforça o papel dessa terapia como estratégia não farmacológica no manejo da dor neuropática.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo, por um lado, propiciaram o avanço do conhecimento prévio de estudos anteriores sobre a relação entre marcadores de estresse oxidativo e manipulação quiroprática, e, por outro lado, constituiu-se no primeiro a mostrar que o ajuste quiroprático assistido por *Impulse*® induz antinocicepção e, em paralelo, provoca alterações em marcadores de estresse oxidativo em nervo isquiático e medula espinal de ratos com dor neuropática induzida por CCI. Como as ROS desempenham papel importante na dor neuropática (GRACE et al., 2016; SALVEMINI et al., 2011), a modulação de marcadores de estresse oxidativo em nervo isquiático e medula espinal pode ser subjacente a mecanismos fisiológicos da terapia manipulativa quiroprática em distúrbios associados à dor neuropática. Assim, o presente estudo fornece novos conhecimentos que estimulam pesquisas futuras a explorarem o efeito analgésico da terapia por manipulação/ajuste quiroprático, e sugere a relevância de ROS como um mecanismo potencial subjacente da terapia.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para continuidade do estudo, propõe-se avaliar os marcadores de estresse oxidativo avaliados no presente estudo em intervalos de tempo menor e maior do que 15 dias. Ainda, propõe-se a avaliar outros biomarcadores de estresse oxidativo, enzimáticos e não-enzimáticos, para melhor compreender a relação entre AQAI e alterações oxidativas no tecido nervoso em condição de dor neuropática.

Propõe-se também a avaliar, em medula espinal de ratos sem e com CCI no nervo isquiático, os quais receberam ou não a aplicação de terapia quiroprática assistida, a expressão de TNF- α e das proteínas p38 e NF κ B. O TNF- α , por possuir ação pró-inflamatória, e a p38 e o NF κ B por estarem envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-145, 2001.
- ASPINALL SL, LEOEUF-YDE C, ETHERINGTON SJ, WALKER BF. Manipulation-induced hypoalgesia in musculoskeletal pain populations: a systematic critical review and meta-analysis. **Chiropractic & Manual Therapies**, v. 27: p. 7, 2019.
- BALIKI M.N., APKARIAN A.V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**. v. 87. p. 474-491, 2015.
- BARON R., BINDER A., WASNER G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**. v. 9. p. 807-819, 2010.
- BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., SCHERRER, G., JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**. v. 139. p. 267-284, 2009.
- BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. **Pain**. v. 33, p. 87-107, 1988.
- BEYERS, M. R.; BONICA, J. J. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: **Assessment of Pain**. p. 26-27, 2001.
- BHAT et al. Effect of ursolic acid in attenuating CCI-induced neuropathic pain in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v.30(6). p.517-528., 2016.
- BIALOSKY, J. E.; BISHOP, M. D.; PRICE, D.D.; ROBINSON, M. E.; GEORGE, S. Z. The Mechanisms of Manual Therapy in the Treatment of Musculoskeletal Pain: A Comprehensive Model. **Man Ther**. v. 14(5), p. 531-538, 2009.
- BINU P, GIFTY K, VINEETHA RC, ABHILASH S, ARATHI P, NAIR RH. Eugenol, a plant-derived phenolic nutraceutical, protects thiol (SH) group in myocardium from ROS-mediated oxidation under chemotherapeutic stress induced by arsenic trioxide – a *in vivo* model study. **Drug Chem Toxicol**, v. 41, p. 352-357, 2018.
- BITTAR, Alice. Reactive oxygen species affect spinal cell type-specific synaptic plasticity in a model of neuropathic pain. **Pain**. Galveston, p. 2137-2146. nov. 2017.
- BOLTON P, BUDGELL BS. Spinal manipulation and spinal mobilization influence different axial sensory beds. **Med Hypotheses**, v. 66, p. 258-62, 2006.
- CAREY E.T., AS-SANIE S. New developments in the pharmacotherapy of neuropathic chronic pelvic pain. **Future Science**. v. 5. p. 148, 2016.

CHEN, Q.Y., TAN, C.Y., WANG, Y., MA, K.T., LI, L., SI, J.Q. Mechanism of persistent hyperalgesia in neuropathic pain caused by chronic constriction injury. **Neural Regeneration Research**, v. 14. p.1091-1098. 2019.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **Bmj**. v. 348, n. feb05 6, p. f7656–f7656, 2014.

COLLOCA L., LUDMAN T., BOUHASSIRA D., BARON R., DICKENSON A.H., YARNITSKY D., et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 3. n. 17002. p.1-19, 2017.

COLLOCA CJ, KELLER TS, BLACK P, NORMAND MC, HARRISON DE, HARRISON DD. Comparison of mechanical force of manually assisted chiropractic adjusting instruments. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v. 28, p. 414-422, 2005.

CONESA-BUENDÍA FM, MEDIERO A, FUJIKAWA R, et al. Beneficial effects of manually assisted chiropractic adjusting instrument in a rabbit model of osteoarthritis. **Scientific Reports**, v. 10, p. 13237, 2020.

CORONADO, R. A.; GAY, C. W.; BIALOSKY J. E.; CARNABY, G. D.; BISHOP, M. D; GEORGE, S. Z. Changes in pain sensitivity following spinal manipulation: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Electromyography and Kinesiology**. v. 22, p. 752–767, 2012.

DAS V. An introduction to pain pathways and pain “targets”. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. v.131. p. 1-30, 2015.

DESANTANA, J. M. et al. Definição de dor revisada após quatro décadas. **BrJP. São Paulo**, v. 3, n. 3, p. 197-8, 2020.

DELLAROZA, M. S. G. *et al.* Dor crônica em idosos residentes em São Paulo, Brasil: prevalência, características e associação com capacidade funcional e mobilidade (Estudo SABE). **Cadernos de Saúde Pública**. v. 29, n. 2, p. 325–334, 2013.

DEPINTOR, J. D. P. *et al.* Prevalence of chronic spinal pain and identification of associated factors in a sample of the population of São Paulo, Brazil: cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal** v. 134, n. 5, p. 375–384, 2016.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. v. 10, n. September, p. 1–17, 2017.

DEXTER DT, HOLLEY AE, FLITTER WD, et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. **Mov Disord**, v. 9, p. 92-7, 1994.

DROGE W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**. v. 82. n. 1. p. 47-95., 2002.

DUARTE FCK, KOLBERG C, RIFFEL APK, SOUZA JA, BELLÓ-KLEIN, A, PARTATA WA. Spinal manipulation therapy improves tactile allodynia and peripheral nerve

functionality and modulates blood oxidative stress marker in rats exposed to knee-joint immobilization. **J Manipulative Physiol Ther**, v. 42, p. 385-98, 2019.

DUARTE FCK, KOLBERG C, BARROS RR, et al. Evaluation of peak force of a manually operated chiropractic adjusting instrument with an adapter for use in animals. **J Manipulative Physiol Ther**, v. 37, p. 236-41, 2014.

DUBNER, R. Pain research in animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 75. p. 128-132, 1983.

DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132, p. 237-251, 2007.

EATON, P., 2006. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. **Free Radical Biology and Medicine**, v.40, n.11, p.1889-1899, 2006.

EL GABBAS, Z. et al. *Salvia officinalis*, rosmatinic and caffeic acids attenuate neuropathic pain and improve function recovery after sciatic nerve chronic constriction in mice. **Evid Based Complement Alternat Med**. 1702378. 2019.

EREL O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**. v.37(4). p.277-285., 2004.

FAN W, SDRULLA AD. Differential modulation of excitatory and inhibitory populations of superficial dorsal horn neurons in lumbar spinal cord by A β -fiber electrical stimulation. **Pain**, v. 161, p. 1650-60, 2020.

FERNANDES, V., SHARMA, D., VAIDYA, S., SHANTANU, P. A., GUAN, Y., KALIA, K., TIWARI, V. Cellular and molecular mechanisms driving neuropathic pain: recent advancements and challenges. **Expert Opinions on Therapeutic Targets**, v. 22, n. 2, p. 131-142, 2018.

FINNERUP N. B., NADINE ATTAL M. D. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. **The Lancet Neurology**. v. 14(2). p. 162-173., 2015.

FEIN A. **NOCICEPTORS: The Cells That Sense Pain**. 2011.

FRIDOVICH I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**. v. 20. p. 1203-1209, 1998.

FRYER, G. & ALAN J. PEARCE, A. J. Lumbosacral Manipulation Effect on Reflex Excitability. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**. v. 35, n. 2, 2012.

GEIS C., GEUSS E., SOMMER C., SCHMIDT H.H., KLEINSCHNITZ C. NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. **Experimental Neurology**. 288. p. 94-103, 2017.

GEORGE, S. Z.; BISHOP, M. D.; BIALOSKY, J. E.; ZEPPIERI, G.; ROBINSON, M. E. Immediate effects of spinal manipulation on thermal pain sensitivity: an experimental study. **BMC Musculoskeletal Disorders**. v. 7:68, 2006.

GRACE P.M., GAUDET A.D., STAIKOPOULOS V., MAIER S.F., HUTCHINSON M.R., SALVEMINI D., WATKINS L.R. Nitroxidative Signaling Mechanisms in Pathological Pain. **Trends in Neurosciences**. v. 39 p. 862-879, 2016.

GREGORY, Nicholas S. et al. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 11, p. 1255-1269, 2013.

GUEDES, R. P. et al. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, p. 1049-1056, 2008.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**. v. 4. 2007.

HEHN, C. A. VON; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. **Neuron**. v. 73, n. 4, p. 638–652, 2012.

HENDERSON, C. N. R. The basis for spinal manipulation: Chiropractic perspective of indications and theory. **Journal of Electromyography and Kinesiology**. v. 22, p. 632–642, 2012.

HOMOLA, S. Chiropractic: history and overview of theories and methods. **Clin Orthop Relat Res**. v.444, p. 236-42, 2006.

HORST, A. et al. N-acetylcysteine downregulates phosphorylated p-38 expression but does not reverse the increased superoxide anion levels in the spinal cord of rats with neuropathic pain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 2, 2017a.

HORST, A.. Effects of N-acetylcysteine on spinal cord oxidative stress biomarkers in rats with neuropathic pain. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**. p. 1-7. out. 2017b.

HORST A., KOLBERG C., MORAES M.S., FINAMOR I.A., BELLÓ-KLEIN A., PAVANATO M.A., et al. Effect of N-acetylcysteine on the spinal-cord glutathione system and nitric-oxide metabolites in rats with neuropathic pain. **Neuroscience Letters**. v. 569. p. 163-168, 2014.

HUANG M-Z, LI J-Y. Physiological regulation of reactive oxygen species in organisms based on their physicochemical properties. **Acta Physiol**, v. 228, e13351, 2020.

JAGGI A.S., JAIN V., SINGH N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 25. p. 1-28, 2011.

JIANG, Z.Y. WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v.26 p.853-856, 1991.

KALLENBORN-GERHARDT et al. NOXious signaling in pain processing. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 137(3). p. 309-317., 2013.

KAVALIERS, M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. **Brain Research**.v. 21. p. 923-931, 1988.

KELLER TS, COLLOCA CJ, MOORE RJ, GUNZBURG R, HARRISON DE. Increased multiaxial lumbar motion response during multiple-impulse mechanical force manually assisted spinal manipulation. **Chiropractic & Osteopathy**, v. 14, p. 6, 2006.

KIM H., et al. Reactive Oxygen Species Donors Increase the Responsiveness of Dorsal Horn Neurons and Induce Mechanical Hyperalgesia in Rats. **Neural Plasticity**. v. 2015. n. 293423, 2015.

KLUSÁKOVA, I.; DUBOVÝ, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – an anatomical perspective. **Annals of Anatomy**, v. 191, p. 248-259, 2009.

KOLBERG C, HORST A, MORAES MS, et al. Peripheral oxidative stress blood markers in patients with chronic back or neck pain treated with high-velocity, low-amplitude manipulation. **J Manipulative Physiol Ther**, v. 38, p. 119-129, 2015.

KOLBERG, C.; HORST, A.; MORAES, M. S, KOLBERG, A.; BELLÓ-KLEIN, A.; PARTATA, W. A. Effect of high-velocity, low-amplitude treatment on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes from men with neck pain. **J Manipulative Physiol Ther**. v. 35(4), p. 295-300, 2012.

KOLBERG, C.; HORST, A.; KOLBERG, A.; BELLÓ-KLEIN, A.; PARTATA, W. A. Effects of high-velocity, low-amplitude manipulation on catalase activity in men with neck pain. **J Manipulative Physiol Ther**. v. 33(4), p. 300-7, 2010.

KOMIRISHETTY, PRASHANTH et al. Combination strategy of PARP inhibitor with antioxidant prevent bioenergetic deficits and inflammatory changes in CCI-induced neuropathy. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 137-147, 2017.

KONONENKO O, MITYAKINA I, GALATENKO V, et al. Differential effects of left and right neuropathy on opioid gene expression. In lumbar spinal cord. **Brain Res**, v. 1695, p. 78-83, 2018.

KUMAR, Anil; KAUR, Harshpreet; SINGH, Arti. Neuropathic pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 2, p. 206-216, 2018.

LANGLEY, P.; RUIZ-IBAN. The association of pain with labor force participation, absenteeism, and presenteeism in Spain. **Journal Of Medical Economics**. Minneapolis, p. 835-845. out. 2011.

LEOPOLDINO, A. *et al.* Prevalence of low back pain in older Brazilians: a systematic review with meta-analysis. **Revista Brasileira Reumatologia**. v. 53, n. 3, p. 258–269, 2016.

LIEBSCHNER MAK, CHUN K, KIM N, EHNI B. *In vitro* biomechanical evaluation of single impulse and repetitive mechanical shockwave devices utilized for spinal manipulative therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 42, p. 2524-36, 2014.

LOESER J.D. The future. Will pain be abolished or just pain specialists? **Minnesota Medicine**. v. 84. p. 1-20, 2001.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology q. v. 137, p. 473–477, 2008.

MACHELSKA H., CELIK M.Ö. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. **F1000Research**. v. 22. p. 27-43, 2016.

MAGRINELLI, F.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. **Practical Neurology**. v. 13, n. 5, p. 292–307, 2013.

MEACHAM et al. Neuropathic pain: central vs. Peripheral mechanisms. **Current Pain and Headache Reports**. v. 6., 2017.

MEINELT, T. *et al.* Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substance of different qualities. **Aquatic Toxicology**. v. 83, n. 2, p. 93–103, 2007.

MILLAN, J. M. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. v. 57. p. 1-164, 1999.

NAIK A.K., TANDAN S.K., DUDHGAONKAR S.P., JADHAV S.H., KATARIA M., PRAKASH V.R., KUMAR D. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. **European Journal of Pain**. v. 10. p. 573-579, 2006.

NEFF SM, OKAMOTO CS. Chiropractic management of a patient with thoracic pain and a stable thoracic aortic aneurysm: A case report. **Journal of Chiropractic Medicine**, v. 16, p. 78-82, 2017.

NICKEL F.T., SEIFERT F., LANZ S., MAIHÖFNER C. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**. v. 22: p. 81-91, 2012.

OSSIPOV M.H., MORIMURA K., PORRECA F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**. v. 8. p. 143-51, 2014.

OWENS, E. F. Chiropractic subluxation assessment: what the research tells us. **J Can Chiropr Assoc**. v. 46, n. 4, 2002.

PASERO, C. Pathophysiology of neuropathic pain. **Pain Management Nursing**. v. 5, n. SUPPL., p. 3–8, 2004.

PICAVET, H.; SCHOUTEN, J. Musculoskeletal pain in the Netherlands: prevalences,

consequences and risk groups, the DMC(3)-study. **Pain**. v. 102, n. 1–2, p. 167–178, 2003.

PICKAR, J. G. & BOLTON, P. S. Spinal Manipulative Therapy and Somatosensory Activation. **J Electromyogr Kinesiol**. v. 22(5), p. 785–794, 2012.

PICKAR, J. G. & KANG, Y. Paraspinal Muscle Spindle Responses To The Duration of A Spinal Manipulation Under Force Control. **J Manipulative Physiol Ther** 2006; 29:22-31.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunology Methods**, v.38, p.161-170, 1980.

PIMENTA, C. Conceitos culturais e a experiência dolorosa. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v. 32, n. 2, 1998.

PIZZINO et al. Oxidative Stress: Harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017. n. 8416763., 2017.

POLJSAK B., ŠUPUT D., MILISAV I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 95. p. 67-92, 2013.

REED WR, CRANSTON JT, ONIFER SM, LITTLE JW, SOZIO RS. Decreased spontaneous activity and altered evoked nociceptive response of rat thalamic submedial neurons to lumbar vertebra thrust. **Exp Brain Res**, v. 235, p. 2883-2892, 2017.

REED WR, CAO D-Y, LONG CR, KAWCHUK GN, PICKAR JG. Relationship between biomechanical characteristics of spinal manipulation and neural responses in an animal model: effect of linear control of thrust displacement versus force, thrust amplitude, thrust duration, and thrust rate. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 492039, 2013.

RIFFEL A.P., DE SOUZA J.A., SANTOS M. C., HORST A., SCHEID T., KOLBERG C., et al. Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Brain Research Bulletin**. v. 121. p. 169-177, 2016.

RIFFEL, A.P. Treatment with ascorbic acid and α -tocopherol modulates oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**. p. 1-11. mar. 2018.

RUBIO CP, HERNÁNDEZ-RUIZ J, MARTINEZ-SUBIELA S, TVARIJONAVICIUTE A, CERON JJ. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. **BMC Vet Res** v. 12, p. 166, 2016.

RUBINSTEIN SM, DE ZOETA A, VAN MIDDELKOOP M, ASSENDELFT WJJ, DE BOER MR, VAN TULDER MW. Benefits and harms of spinal manipulative therapy for the treatment of chronic low back pain: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **BMJ**, v. 364, p. 1689, 2019.

SALVEMINI, D. et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 951-966, 2011.

SALMON, Adam B.; RICHARDSON, Arlan; PÉREZ, Viviana I. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 5, p. 642-655, 2010.

SCHEID T., BOSCO L.D., GUEDES R.P., PAVANATO M.A., BELLÓ-KLEIN A., PARTATA W.A. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. **Journal of Neurochemistry**. v. 38: p. 935-942, 2013.

SCHEID, Taína. Effects of Methanol Fraction from Leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi on Nociception and Spinal-Cord Oxidative Biomarkers in Rats with Neuropathic Pain. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**. p. 1-11. maio 2018.

SIES, Helmut. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. Düsseldorf, p. 180-183. abr. 2015.

SKYBA DA, RADHAKRISHNAN R, ROHLWING JJ, WRIGHT A, SLUKA KA. Joint manipulation reduces hyperalgesia by activation of monoamine receptors but not opioid or GABA receptors in the spinal cord. **Pain**, v. 106: p. 159-68, 2003.

SÖDERGREN E. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. **Journal Of Biochemical And Biophysical Methods**. Uppsala, p. 137-146. nov. 1998.

SONG XJ, HUANG ZJ, SONG WB, et al. Attenuation effect of spinal manipulation on neuropathic and postoperative pain through activating endogenous anti-inflammatory cytokine interleukin 10 in rat spinal cord. **J Manipulative Physiol Ther**, v. 39, p. 42-53, 2016.

SONG XJ, GAN Q, CAO JL, WANG ZB, RUPERT RL. Spinal manipulation reduces pain and hyperalgesia after lumbar intervertebral foramen inflammation in the rat. **J Manipulative Physiol Ther**, v. 29, p. 5-13, 2006.

SÖZBIR, E.; NAZIROGLU, M. Diabetes enhances oxidative stress-induced TRPM2 channel activity and its control by N-acetylcysteine in rat dorsal root ganglion and brain. **Metabolic Brain Disease**. Isparta, p. 385-393. abr. 2016.

THOMPSON D.A., HOBELMANN J.G., COMPTON P. Providing chronic pain management in the "Fifth Vital Sign" Era: Historical and treatment perspectives on a modern-day medical dilemma. **Drug Alcohol Dependence**. v. 173 p. 11-21, 2017.

TREED R-D, RIEF W, BARKE A, et al. Chronic pain as symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **Pain** v. 160, p. 19-27, 2019.

TRIERWEILER, J.; GÖTTERT, D. N.; GEHLEN, G. Evaluation of Mechanical Allodynia in an Animal Immobilization Model Using the Von Frey Method. **J Manipulative Physiol Ther**. v.35, n.1, p.18-25, 2012.

TROMM, C.B. *et al.* Effect of different frequencies weekly training on parameters of oxidative stress. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v.14, n.1, p.52-60. 2012.

TU, W-Z *et al.* Effect of electro-acupuncture on the BDNF-TrkB pathway in the spinal cord of CCI rats. **Int J Mol Med**, v. 41, p. 3307-3315, 2018.

UDALL, M., KUDEL, I., CAPPELLERO, J.C., SADOSKY, A., KING-CONCIALDI, K., PARSONS, B., HLAVACEK, P., HOPPS, M., SALOMON, P.A., DIBONAVENTURA, M.D., CLARK, P., GARCIA, J.B.S. Epidemiology of physican-diagnosed neuropathic pain in Brazil. **Journal of Pain Research**, v. 12. p. 243-253. 2019.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North American**, v. 91.p. 1-12. 2007.

VAN HECKE, O. *et al.* Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**. v. 155, n. 4, p. 654–662, 2014.

XU X, FU S, SHI X, LIU R. Microglial BDNF, PI3K, and p-ERK in the spinal cord are suppressed by pulsed radiofrequency on dorsal root ganglion to ease SNI-induced neuropathic pain in rats. **Pain Res Manag**, v. 2019, p. 5948686, 2019.

WANG, H.D.; PAGANO, P.J.; DU, Y.; CAYATTE, A.J.; QUINN, M.T.; BRECHER, P.; COHEN, R.A. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. **Circulation Research**, v.82, p.810-818, 1998.

WIECH, K. Deconstructing the sensation of pain: The influence of cognitive processes on pain perception. **Science**. v. 354, n. 6312, p. 584–587, 2016.

ZHANG G, LIU N, ZHU C, *et al.* Antinociceptive effect of isoorientin against neuropathic pain induced by the chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 75, p. 105753, 2019.

ZHAO H., *et al.* The role of microglia in the pathobiology of neuropathic pain development: what do we know? **British Journal of Anaesthesia**. v. 118. p. 504-516, 2017.

ZHAO Z-Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Prog Neurobiol**, v. 85, p. 355-75, 2008.

ANEXO I



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 32773

Título: EFEITO DO AJUSTE QUIROPRÁTICO (IMPULSE®) SOBRE NOCICEPÇÃO E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM NERVO ISQUIÁTICO E MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA

Vigência: 01/05/2017 à 31/05/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

WANIA APARECIDA PARTATA - coordenador desde 01/05/2017
Francielle Braz Oliveira da Silva - Aluno de Mestrado desde 01/05/2017

Equipe Externa:

Carolina Kolberg - pesquisador desde 01/05/2017

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 22/05/2017 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 105 ratos da linhagem Wistar, adultos, machos, com peso de 200-250g, provenientes do CREAL; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 2 de Junho de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética