



Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde
Mestrado e Doutorado - UNISUL

FERNANDA MADEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IMERSÃO DIÁRIA EM ÁGUA TERMOMINERAL
DE CALDAS DA IMPERATRIZ-SC NA INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA EM
CAMUNDONGOS**

PALHOÇA

2016

FERNANDA MADEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IMERSÃO DIÁRIA EM ÁGUA
TERMOMINERAL DE CALDAS DA IMPERATRIZ-SC NA INFLAMAÇÃO
PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Co-orientador: Prof. Fernando Hellmann, Dr.

PALHOÇA

2016

FERNANDA MADEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IMERSÃO DIÁRIA EM ÁGUA
TERMOMINERAL DE CALDAS DA IMPERATRIZ-SC NA INFLAMAÇÃO
PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Mestrado, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Palhoça, 07/2016.

Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL

Profa. Anna Paula Piovezan, Dra.

Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL

Profa. Franciane Bobinski, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina - UDESC

Dedico este trabalho em especial a Deus, aos meus pais e ao grande amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a Deus, por ter me dado essa grande oportunidade que é estudar.

Aos meus pais por ter me dado carinho, educação, muito amor, e acima de tudo por sempre ter me incentivado a estudar cada vez mais.

A minha noiva Micheli, que esteve sempre do meu lado, me dando força, e fazendo com que eu jamais desistisse dos meus sonhos.

Ao meu orientador, que sempre se mostrou disposto, não medindo esforços para me ajudar a chegar até aqui. Obrigada por todo carinho e ensinamento.

Ao meu grande amigo Luiz Belmonte, por todos os conselhos, por todas as ajudas e por acreditar em mim.

Aos colegas de laboratório pelas experiências vividas.

Aos camundongos por serem instrumentos fundamentais para a realização desta pesquisa.

A CAPES e a UNISUL por financiar minha bolsa.

Agradeço a todos que de alguma forma veio a somar nesta caminhada.

OBRIGADA!

“A presença dos sonhos transforma os miseráveis em reis, faz dos idosos, jovens, e a ausência deles transforma milionários em mendigos faz dos jovens idosos. Os sonhos trazem saúde para a emoção, equipam o frágil para ser autor da sua história, fazem os tímidos terem golpes de ousadia e os derrotados serem construtores de oportunidades”. Sonhe!

Augusto Cury.

RESUMO

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da imersão diária em água termomineral de Caldas da Imperatriz-SC em um modelo pré-clínico de dor inflamatória.

Métodos: Após aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL – CEUA/UNISUL sob o protocolo nº 16.009.4.01.IV, camundongos *Swiss* machos (25 a 35g) receberam uma injeção intraplantar do adjuvante completo de Freund (CFA). Vinte quatro horas após a injeção iniciou-se os tratamentos com imersão em água termomineral (ATM) por 3, 10 ou 30 minutos, sendo realizados seis dias por semana durante três semanas. A hiperalgesia mecânica e o edema foram analisados. Por fim, as concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias foram determinadas na pata e na medula espinal no final da primeira semana após a injeção.

Resultados: a imersão diária em ATM por diferentes tempos reduziu a hiperalgesia mecânica na pata dos animais, sendo este efeito dependente do tempo de imersão; O tratamento diário por imersão diária em ATM induziu efeito somatório, evidenciado pelo prolongamento da resposta antihiperalgésica nas avaliações dos decursos temporais; A imersão diária em ATM restabeleceu a resposta sensorial dos animais mesmo após o final dos tratamentos; A imersão diária em ATM não alterou o edema na pata dos animais com inflamação; Além disso, os resultados encontrados aqui apontam que os tratamentos por imersão em ATM reduziram a hiperalgesia por reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias e aumentar as concentrações de citocinas anti-inflamatórias na pata dos animais com inflamação e; também por reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias na medula espinal dos camundongos com inflamação periférica.

Conclusão: o presente estudo apresenta evidências de que a BT realizada com ATM de Santo Amaro da Imperatriz-SC reduz a hiperalgesia mecânica inflamatória, mas não alterou o edema, em um modelo animal de dor inflamatória periférica persistente.

Palavras-chave: Balneoterapia. Dor inflamatória. Citocinas.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to evaluate the effects of daily immersion in thermomineral water from Caldas da Imperatriz-SC in a preclinical model of inflammatory pain.

Methods: After approval of the protocol by the Ethics Committee on Animal Use UNISUL - CEUA / UNISUL (Protocol 13.0064.08.IV), male Swiss mice (25 to 35g) received an intraplantar injection of complete Freund's adjuvant (CFA). Twenty-four hours after the injection we initiated the immersion treatments with thermomineral water (ATM for "água termomineral" in portuguese). 3, 10 or 30 minute treatments were performed six days a week for three weeks. Mechanical hyperalgesia and edema were evaluated. Additionally, at the end of first week after injection the concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in the paw and spinal cord were determined.

Results: Daily ATM immersion reduced the mechanical hyperalgesia in a dose dependent effect (corresponding to immersion time); Daily treatment with immersion in ATM induced a summed effect, which can be evidenced by the extension of the anti-hyperalgesic response in the time-course evaluations; daily immersion in ATM restored sensory response even after the end of the treatment; daily immersion in ATM did not affect paw edema. Furthermore, our findings indicate that immersion treatment reduced hyperalgesia through a reduction of pro-inflammatory cytokines and concomitant increase of anti-inflammatory cytokine concentration in animal's paws; in association with a decrease of pro-inflammatory cytokines spinal cord concentration.

Conclusion: This study provides evidence that BT (balneotherapy) carried out with ATM from Santo Amaro da Imperatriz, SC reduces inflammatory mechanical hyperalgesia, but does not decrease edema in an animal model of persistent peripheral inflammatory pain.

Keywords: Spa Therapy. inflammatory pain. Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AED - amplo espectro dinâmico

ATP - Trifosfato de adenosina

ATM – Água termomineral

AR – reumatoide

AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina

BT – balneoterapia

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX – Ciclooxygenase

Cg - carragenina

CINC-1 - quimiocina quimioatrativa de neutrófilos-1

CaMK – Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina

Ca²⁺ - íon cálcio

CPME – Corno posterior da medula espinal

COFFITO - Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional

SC - Santa Catarina

CFA - Adjuvante Completo de Freund

ERK - quinase regulada por sinal extracelular

GSNE - gânglio sensorial do nervo espinal

IL-1 β - interleucina-1 beta

IL-6- interleucina-6

IL-10 - interleucina-10

IL-4 – interleucina-4

IL-13 – interleucina-13

IL-8 – Interleucina-8

JNK - Jun quinase N-terminal

LPS - lipopolissacarídeo

LANEX - Laboratório de Neurociência Experimental

MIA - morte indolor assistida

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno

NMDA – Ácido N-Metil-D-Aspartato

NGF – Fator de crescimento do nervo

NO - óxido nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

OA – osteoartrite

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PGE2 – Prostaglandina E2

PKA – Proteína cinase A

PKC – Proteína cinase C

PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase

Ra – Rádio

SUS - Sistema Único de Saúde

TRPA1 – Receptor de potencial transiente ankyrin 1

TRPV1 – Receptor vaniloide de potencial transitório 1

TNF- α - necrose tumoral-alfa

Th – Tório

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

ILUSTRAÇÕES

Lista de figuras

Figura 1 – Eventos do processo inflamatório.....	19
Figura 2 – Influência das citocinas na dor e inflamação.....	21
Figura 3 - Tratamento por imersão em ATM.....	35
Figura 4 - Desenho experimental.....	35
Figura 5 - Efeito da imersão diária em ATM sobre a hiperalgesia mecânica de origem inflamatória na primeira semana de tratamento.....	41
Figura 6 - Efeito da imersão diária em ATM sobre a hiperalgesia mecânica de origem inflamatória na segunda semana de tratamento.....	43
Figura 7 - Efeito da imersão diária em ATM sobre a hiperalgesia mecânica de origem inflamatória na terceira semana de tratamento.....	44
Figura 8 - Efeito do tratamento repetido por meio da imersão diária em ATM sobre a hiperalgesia mecânica de origem inflamatória.....	46
Figura 9 - Efeito da imersão diária em ATM no edema de pata.....	47
Figura 10 - Efeito da imersão diária em ATM sobre as concentrações de citocinas na pata.....	48
Figura 11 - Efeito da imersão diária em ATM sobre as concentrações de citocinas na medula espinal.....	50

Lista de tabelas

Tabela 1– Elementos químicos encontrados na análise das fontes de águas termais do Hotel Caldas da Imperatriz (2013).....	29
Tabela 2 –Características Físico-químicas encontrados na análise das fontes de águas termais do Hotel Caldas da Imperatriz (2013).....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
1.1.1 Inflamação e dor.....	16
1.1.1.1 Citocinas pró-inflamatórias e hiperalgesia inflamatória.....	20
1.1.1.2 O papel do TNF- α na hiperalgesia inflamatória.....	22
1.1.1.3 O papel da IL-1 β na hiperalgesia inflamatória.....	24
1.1.1.4 Citocinas anti-inflamatórias e hiperalgesia inflamatória.....	25
1.1.1.5 O papel de IL-10 na hiperalgesia inflamatória.....	25
1.1.2 Termalismo - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde.....	26
1.1.3 Águas termominerais de Caldas da Imperatriz – SC.....	27
1.1.3.1 Contexto histórico.....	27
1.1.4 Tratamento da dor por ATM.....	30
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 MÉTODOS.....	33
3.1 CONFLITO DE INTERESSE.....	33
3.2 TIPO DE PESQUISA.....	33
3.3 ANIMAIS.....	33
3.4 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO.....	34
3.5 TRATAMENTOS COM ATM.....	34
3.6 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA.....	36
3.7 MENSURAÇÃO DO EDEMA NA PATA.....	37
3.8 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO LIGADO A ENZIMA (ELISA).....	37
3.9 MORTE INDOLOR ASSISTIDA (MIA).....	38
3.10 FÁRMACOS E REAGENTES.....	38
3.11ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 EFEITO DA IMERSÃO DIÁRIA EM ATM SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA.....	40

4.2 EFEITO DA IMERSÃO DIÁRIA EM ATM SOBRE O EDEMA DA PATA.....	47
4.3 EFEITO DA IMERSÃO DIÁRIA EM ATM SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS DA PATA.....	48
4.4 EFEITO DA IMERSÃO DIÁRIA EM ATM SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS DA MEDULA ESPINAL.....	49
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

A dor crônica ou persistente é um problema de saúde pública comum que gera enormes gastos em cuidados da saúde, uma vez que está associada ao comprometimento funcional levando à diminuição da qualidade do indivíduo acometido¹. A dor inflamatória é um dos sintomas mais comuns em doenças de cunho inflamatório. Ela é causada principalmente pela sensibilização dos neurônios nociceptivos periféricos pela ação direta de mediadores pró-inflamatórios^{2,3}. Em estudos pré-clínicos de dor inflamatória, o modelo de inflamação periférica induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA) está bem estabelecido e permite a quantificação dos mediadores envolvidos nas alterações celulares durante o processo inflamatório⁴. Este modelo caracteriza-se por infiltração de neutrófilos, bem como pela liberação de outros mediadores químicos a partir dos neutrófilos ativados, tais como as citocinas inflamatórias⁴. Entre as substâncias pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e as interleucina-1 beta (IL-1 β) são as principais citocinas que sensibilizam e/ou ativam, os neurônios da via da dor⁵⁻⁷. A inibição desses mediadores constitui alvos terapêuticos importantes no controle da dor crônica.

Desde o final da década de 70 a Organização Mundial da Saúde (OMS) trabalha com a política incentivadora para que as práticas integrativas e complementares passem a ser utilizadas nos sistemas nacionais de atenção à saúde, apoiando, em contrapartida, estudos científicos que comprovem e esclareçam os mecanismos que fundamentam essa forma de tratamento. No Brasil essas práticas vêm ganhando destaque inclusive com sua implementação no Sistema Único de Saúde (SUS)⁸. Em 03 de Maio de 2006 foi aprovada a portaria nº 971 que defende a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Foram definidas diretrizes, linhas de ações e responsabilidades para a inclusão das Plantas Medicinais/Fitoterapia, Homeopatia, Medicina Tradicional Chinesa/Acupuntura, Medicina Antroposófica e o Termalismo/Crenoterapia como opções terapêuticas⁸. Ainda, o Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional (COFFITO) pela RESOLUÇÃO COFFITO nº. 380, de 3 de

novembro de 2010 resolveu pelo Artigo 1º autorizar a prática pelo Fisioterapeuta dos atos complementares ao seu exercício profissional regulamentado, nos termos desta resolução e da portaria MS número 971/2006, na qual inclui o termalismo⁹.

Conforme a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, “O Termalismo compreende as diferentes maneiras de utilização da água mineral e sua aplicação em tratamentos de saúde”⁸. No Brasil, Caldas da Imperatriz em Santa Catarina (SC), é reconhecida como a primeira estância termal. Em 1845, o imperador Dom Pedro II e sua esposa Teresa Cristina, banharam-se com as águas do local. Em base de algum conhecimento popular, sobre os benefícios daquelas águas, as primeiras ideias sobre a construção de um hospital em Caldas da Imperatriz foram lançadas pelo militar português João Vieira Tovar e Albuquerque que enviou um ofício a Portugal descrevendo os efeitos benéficos observados nos pacientes que se banhavam nas águas. Em resposta a carta, Dom João VI aprovou o projeto, reconhecendo aquelas águas como tratamento eficaz para várias doenças e no uso da reabilitação¹⁰.

Atualmente em Santo Amaro da Imperatriz-SC o hospital termal tornou-se um hotel administrado pela prefeitura local¹¹, onde pessoas de todo o Brasil banham-se nas piscinas e banheiras com o intuito de tratar quadros dolorosos variados, mas principalmente de origem inflamatória. Recentemente o SUS passou a oferecer o tratamento gratuito a todos moradores da cidade de Santo Amaro da Imperatriz.¹² No entanto, o interesse pelo termalismo em Caldas da Imperatriz ainda não é devido aos benefícios terapêuticos da água demonstrados por pesquisas científica. A exemplo da época do Brasil imperial, o que atrai essas pessoas a região ainda são relatos vivenciados por outras pessoas. Assim surgiu a seguinte pergunta de pesquisa: A água termomineral (ATM) de Caldas da Imperatriz-SC realmente podem exercer influência sobre o processo inflamatório?

Para responder estas questões buscou-se em um ambiente controlado como laboratório, induzir experimentalmente em camundongos uma inflamação

periférica a qual produz os sinais e sintomas da inflamação que são observados em seres humanos, principalmente dor e edema.

Assim entende-se que os resultados do presente projeto de pesquisa impactarão diretamente na prescrição de banhos terapêuticos utilizando as águas termais, proporcionando mais segurança para os profissionais da saúde (que prescrevem) e principalmente para a sociedade que utiliza este tipo de tratamento para dor crônica.

1.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO

1.1.1 Inflamação e dor

Inflamação é o principal evento da resposta imunológica inata, com a finalidade de reparar o tecido lesionado, desde lesões teciduais leves à agressões grave que perturbam a homeostase do organismo^{13,14}. A intensidade da resposta inflamatória depende da natureza da agressão inflamatória, podendo ser bacteriana, viral ou parasitaria¹⁵. Apresenta um papel importante na manutenção de muitas doenças crônicas^{16,17}, assim como, a sua persistência pode levar a distúrbios autoimunes, auto-inflamatórios, neurodegenerativos e até mesmo ao câncer¹⁸.

A resposta do tecido, à lesão dá origem aos sinais cardinais da inflamação tais como rubor, tumor, calor, dor e perda da função^{16,19,20}. Uma das características principais da inflamação é a dor. Acredita-se que entre a população mundial total, um quinto de pessoas sofre de dor crônica. A economia da Europa tem altos custos relacionados a esses dados, pois geram um gasto de 28 bilhões de dólares a cada ano²¹.

O processamento da dor é um fenômeno complexo que ocorre basicamente em 5 passos importante, sendo eles a transdução, transmissão, condução, modulação e percepção do estímulo nocivo²². Em humanos e animais tais como roedores, o estímulo nocivo é detectado por estruturas

especializadas denominadas de nociceptores, localizados nas terminações periféricas dos neurônios nociceptivos periféricos²³. A transmissão do sinal nociceptivo é mediada por fibras especializadas em detectar estímulos nocivos. As fibras que conduzem o estímulo doloroso são as fibras do tipo A δ e do tipo C. Estas fibras são pouco mielinizadas ou não mielinizadas, respectivamente²⁴.

Os neurônios nociceptivos periféricos por meio de proteínas específicas (nociceptores), transformam um estímulo físico nocivo de natureza mecânica, térmica ou química em um potencial elétrico. Este fenômeno é denominado de transdução, sendo o primeiro passo no processamento da dor. Após este evento o sinal elétrico passa da periferia para o sistema nervoso central. Isso ocorre na medula espinal especificamente no corno posterior da medula espinal (CPME). Nesta região ocorre a primeira sinapse da via da dor. A medula espinal pode ser dividida em 10 lâminas, como proposta por²⁵. O CPME encontra-se posteriormente ao canal vertebral da medula espinal, correspondendo as 6 primeiras lâminas de acordo com esta classificação. No CPME os potenciais elétricos podem ser transmitidos ou suprimidos por mecanismos facilitatórios ou inibitórios²⁶. Os neurônios da medula espinal que se projetam na lâmina I, geralmente respondem a uma estimulação nociceptiva, detectada por fibras A δ e C, os neurônios nas lâminas III e IV respondem principalmente a estímulos inócuos e os neurônios da lâmina V recebem tanto estímulos inócuos, por meio das fibras A δ e A β como também estímulo nociceptivo, por meio das fibras do tipo C. Estes últimos são chamados de neurônios de amplo espectro dinâmico (AED), pois respondem a distintos estímulos²⁷.

A estimulação contínua dos neurônios nociceptivos periféricos induz a liberação de neurotransmissores que ativam receptores pós-sinápticos. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido nesse processo, que ativa receptores do tipo NMDA (Ácido N-Metil-D-Aspartato) e não-NMDA responsáveis pela transmissão do estímulo nociceptivo²⁸.

Os neurônios de projeção nas lâminas I e V constituem a maior saída do CPME para o encéfalo²⁹. Estes neurônios são a origem de muitas vias ascendente, incluindo o trato espinotalâmico, que está associado a localização e intensidade da experiência dolorosa, e o trato espinoreticular, associado a

estímulos dolorosos, não pontuais. Esses dois sistemas conduzem a informação nociceptiva até o diencefalo. O tálamo é a área chave para o processamento somatossensorial da informação nociceptiva, onde ocorre uma modulação e projeção para áreas corticais. No encéfalo a percepção da dor ocorre em várias regiões³⁰. É necessário que haja uma ativação do córtex somatossensorial, que esta relacionado com propriedades sensoriais-discriminativa, assim como a ativação do córtex cíngulado anterior e córtex insular, relacionado com aspectos emocionais³¹.

O processamento da dor (periférico e central) pode torna-se mais complexo em condições ou agravos inflamatórios onde estas vias neuronais amplificam suas respostas normais em função das alterações do funcionamento dos canais iônicos causada por mediadores inflamatórios que são liberados na fase aguda e crônica da inflamação³².

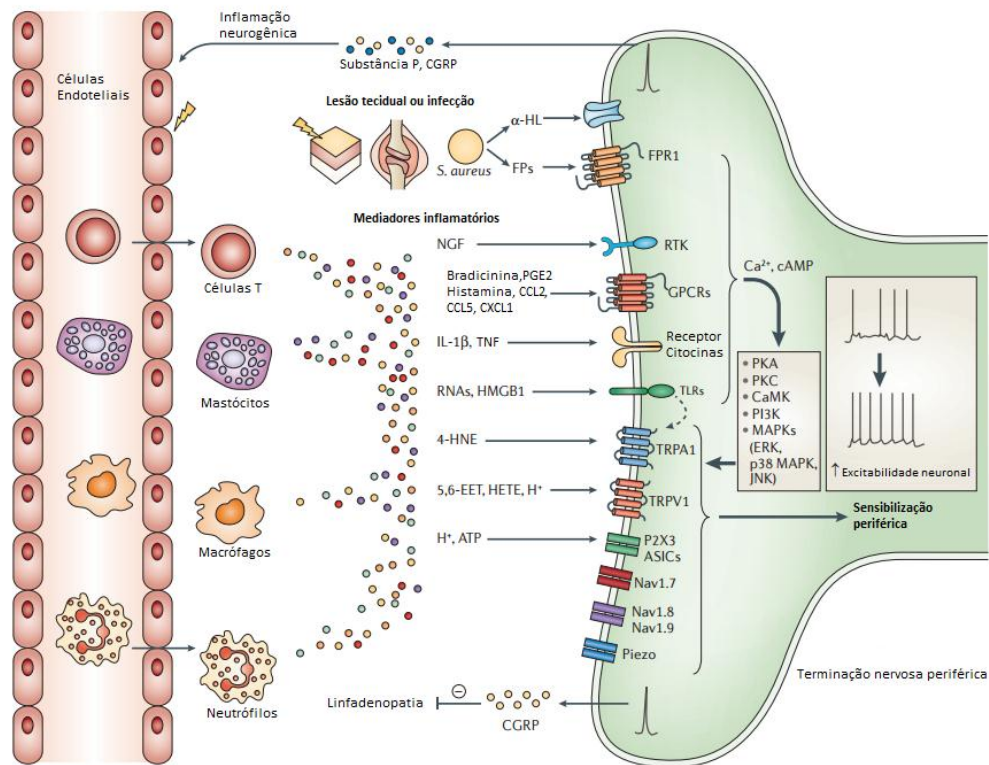
Temporalmente, a inflamação é dividida em duas fases, uma aguda e outra crônica. A primeira fase da inflamação (aguda), tem duração relativamente curta, podendo durar horas ou dias^{32,33}, nesta fase o rubor é mais evidente. Este se dá pela vasodilatação que ocorre no tecido lesionado, sendo mediado principalmente pelo óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, o que facilita a migração de células inflamatórias até o local da lesão³⁴. Paralelamente a vasodilatação, ocorre um aumento da permeabilidade do vaso levando a um aumento do fluxo sanguíneo facilitando a formação do edema rico em proteína. A liberação de substâncias vasoativas tais como: histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do complemento, substância P e fator ativador de plaquetas (PAF) são os principais elementos do desvio do líquido do compartimento intravascular para o local da lesão. Estes processos envolvem a ativação das principais células do sistema imune, incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, células dendríticas, mastócitos, células T e células B (Figura 1). Estes eventos são controlados por uma série de reguladores extracelulares, incluindo as citocinas e quimiocinas que medeiam tanto o recrutamento de células imunes quanto mecanismos de controle de sinalização intracelulares¹.

A segunda fase da resposta aguda está relacionada principalmente à ativação do sistema imune e migração celular para o sítio do tecido inflamado.

A migração celular refere-se a um fenômeno chamado de quimiotaxia, movimento de células como leucócitos e outras células fagocitárias para o local da lesão. São movimentadas a partir da liberação de mediadores químicos e citocinas – responsáveis pelo desencadeamento de respostas imunes³⁵. Caso a inflamação aguda não se resolva, ela se torna crônica³⁶. Geralmente está associado ao fato do organismo não conseguir neutralizar ou diminuir a ação do agente agressor, facilitando a penetração tecidual de células como leucócitos, na tentativa de destruir e regenerar o tecido conjuntivo. Este fenômeno promove a cicatrização e protege o organismo contra infecções³⁷.

Em quadros de dor crônica o aumento da resposta a estímulos nocivos térmicos e mecânicos é denominado hiperalgesia. Esta resposta é resultado da sensibilização de nociceptores presentes nos terminais dos neurônios nociceptivos periféricos (sensibilização periférica), na qual está associada ao aumento da responsividade dos neurônios do CPME - neurônios nociceptivos centrais, fenômeno conhecido como sensibilização central³⁸⁻⁴⁰. A alodinia também pode estar presente, sendo definida como uma resposta dolorosa a estímulos que normalmente são inóculos⁴¹⁻⁴³.

Figura 1 – Eventos do processo inflamatório.



Legenda: Liberação de substâncias inflamatória e nociceção periférica. Após uma lesão ou infecção é causado um processo inflamatório, onde irá ocorrer a migração de células do sistema imunológico, tais como células T, macrófagos, mastócitos e neutrófilos para o local da lesão. Essas células irão liberar mediadores inflamatórios, como, bradicinina, Prostaglandina E₂ (PGE₂), H⁺, ATP, o fator de crescimento do nervo (NGF), citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 e quimioquinas pró-inflamatórias (CCL2, CCL5 e CXCL1). Os nociceptores expressam receptores específicos para esses mediadores inflamatórios, incluindo receptores de citocinas como TNF- α e IL-1 β , receptores acoplados à proteína, ionotrópicos e receptores de tirosina-quinase, e resultado de sua ativação a geração de mensageiros secundários, tais como Ca²⁺ e Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) cíclico e, que por sua vez ativam várias quinases, como a proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), dependente de cálcio / calmodulina- proteína quinase (CaMK), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e as proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) *quinase regulada por sinal extracelular* (ERK), p38 MAPK e Jun quinase N-terminal (JNK). A ativação desses receptores leva a um quadro de excitabilidade neuronal, conhecido como sensibilização periférica, por meio da modulação de moléculas-chave de transdução, como receptor de potencial transitório da subfamília de canal de cátions, subfamília A, membro 1 (TRPA1), TRPV1 e Piezo (um canal iônico ativado por estiramento), bem como canais de sódio regulado por voltagem como Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9. Fonte: Adaptado de Hans-Georg Schaible, 2014⁴⁴.

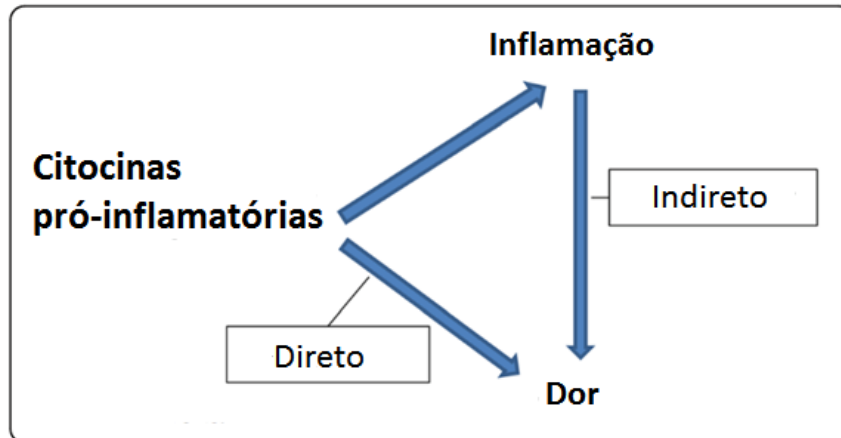
1.1.1.1 Citocinas pró-inflamatórias e hiperalgesia inflamatória

As citocinas inflamatórias são moléculas proteicas extracelulares, glicosiladas, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células em resposta a uma variedade de estímulos e constituem uma ligação entre lesão celular ou reconhecimento e desenvolvimento de sinais e sintomas locais e sistêmicos de inflamação⁶. Células residentes, incluindo as células dendríticas, macrófagos, linfócitos e os mastócitos que são componentes do tecido, depois de reconhecer os estímulos inflamatórios liberam uma cascata de citocinas, as quais desempenham um papel essencial no desenvolvimento da dor inflamatória, bem como outros eventos inflamatórios. As primeiras citocinas descritas a participarem no desenvolvimento da dor inflamatória foram o TNF- α , IL-1 β , IL-6, e as quimiocinas IL-8, a quimiocina quimioatrativa de neutrófilos-1 (CINC-1) e a quimiocinas derivada do queratinócito⁶.

As citocinas são os principais mediadores inflamatórios responsáveis pela indução e a manutenção de doenças como a artrite reumatóide (AR) e osteoartrite (OA). O reconhecimento que citocinas são os principais orquestradores na artrite reumatóide tem levado a ponderosa terapia modificadora da doença, na qual é baseada na neutralização de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α ^{45,46}. Dores artríticas têm características típicas. O paciente pode experimentar dor contínua na ausência de qualquer estímulo intencional. Se estímulos mecânicos, tais como movimentos na amplitude de movimento normal e palpação da articulação podem evocar dor, o paciente está em um estado de hiperalgesia mecânica. Se estímulos quentes ou frios normalmente não dolorosos evocam a dor, o paciente experimenta hiperalgesia térmica^{47,48}.

As citocinas podem contribuir indiretamente para a dor por meio da produção de inflamação que causa a liberação de muitos mediadores que atuam nos neurônios (por exemplo, PGE), bem como diretamente, atuando nos próprios neurônios^{49,50} (Figura 2).

Figura 2 – Influência das citocinas na dor e inflamação.



Legenda: Esquematização de como as citocinas pró-inflamatórias podem contribuir para a geração de dor. De maneira indireta as citocinas induzem a liberação de mediadores sensibilizantes, tais como as PGE, que são produzidos durante inflamação. A forma direta mostra a ação direta das citocinas sobre neurônios sensoriais. Fonte: Adaptado de Hans-Georg Schaible, 2014⁵¹.

Neurônios nociceptivos periféricos detectam citocinas na articulação inflamada. No entanto, as citocinas podem ter um impacto sobre os neurônios também em outros locais. Em primeiro lugar, durante a artrite macrófagos e outras células inflamatórias podem invadir o gânglio sensorial do nervo espinal (GSNE) onde os corpos celulares dos neurônios sensoriais estão localizados^{48,52}.

Em segundo lugar, as citocinas podem ser produzidas e liberadas a partir de células gliais da medula espinal que podem ser ativadas no decurso de doenças articulares⁵³. Assim, a patologia articular pode criar um estado no qual citocinas dentro do sistema nervoso central, também estão envolvidas na geração da dor e, possivelmente, de outros sintomas. Finalmente, as citocinas na medula espinal pode até mesmo influenciar a patologia periférica, modificando os sistemas neuronais eferentes que atuam sobre os tecidos periféricos^{54,55}.

Os parágrafos seguintes concentram-se nas citocinas pró- e anti-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1 β e interleucina-10 (IL-10), porque elas têm sido especialmente investigadas em processos inflamatórios e na dor articular.

1.1.1.2 O papel da TNF- α na hiperalgesia inflamatória

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória importante na AR⁴⁵, e pode também desempenhar um papel na OA⁴⁶ ele também atua em neurônios. Uma grande proporção de neurônios do GSNE de ratos expressa ambos os receptores para o TNF (R1TNF e R2TNF). Alguns autores identificaram o R1TNF apenas em neurônios e o TNFR2 em células não-neuronais do GSNE⁵⁶. Assim, tem sido demonstrado que o TNF- α induz um estado de sensibilização persistente em nociceptores para estímulos mecânicos (uma base para a hiperalgesia mecânica) nas articulações, semelhante à inflamação⁵².

Embora alguns efeitos neuronais do TNF- α pode ser indiretos e envolver outros mediadores, os efeitos neuronais diretos de TNF- α são provavelmente porque, conforme tem sido demonstrado, o TNF- α provoca hiperexcitabilidade em neurônios isolados do GSNE⁵². O mecanismo no qual leva o TNF- α induzir sensibilização dos neurônios nociceptivos periféricos parece ser pelo aumento da sensibilidade e/ou da expressão de canais de iônicos que participam da transdução de estímulos mecânicos e térmicos (por exemplo, receptor de potencial transiente [TRP]), e/ou por meio do aumento da sensibilidade de canais iônicos dependentes de voltagem envolvidos na excitabilidade geral de neurônios sensoriais da geração de potenciais de ação^{56,57}.

O canal iônico de potencial transiente vanilóide (TRPV1) é aberto por estímulo térmico ao calor, e o influxo de íons converte o estímulo térmico em um potencial elétrico. Quando o TRPV1 é sensibilizado, ele abre a temperaturas mais baixas do que o normal, e esta queda de limiar é essencial para a geração de hiperalgesia térmica^{56,57}. A aplicação aguda de TNF- α

também sensibiliza canais iônicos do tipo TRPV1 em neurônios nociceptivos cutâneos, resultando no aumento da liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) induzida pelo calor a partir de terminais nervosos sensoriais na pele de ratos⁵⁸. Assim, o TNF- α pode causar hiperalgesia térmica adicional por meio da regulação positiva de TRPV1.

Assim como na periferia, a medula espinal é um sítio importante para a geração de dor clinicamente relevante. Durante o desenvolvimento da inflamação na articulação, neurônios nociceptivos centrais (medula espinal) desenvolvem um estado de hiperexcitabilidade (chamado sensibilização central), que aumenta o ganho do processamento nociceptivo⁵⁹. O TNF- α neste contexto, é importante, pois é produzido não apenas no tecido inflamado, mas também na medula espinal, pelas células da glia⁵³.

Interessantemente, tem sido demonstrado que o TNF- α em ambos os sítios articulação – periferia - quanto e na medula espinal - central - afeta o processamento nociceptivo na espinal medula. No entanto, a aplicação espinal de um bloqueador da atividade do TNF- α (*etanercept*) ou anticorpo para R1TNF durante o desenvolvimento de inflamação articular atenuou significativamente a geração de hiperexcitabilidade espinal evocada pela inflamação, que é caracterizada por dor disseminada para outros locais. Estes resultados indicam que a produção e a liberação de TNF- α na medula espinal suporta a geração de hiperexcitabilidade espinal evocada pela inflamação⁶⁰. Concomitante a estes achados, o TNF- α espinal também está implicado no controle neuronal da inflamação na articulação pois aplicação intratecal de inibidores de TNF- α significativamente atenuam a inflamação articular^{55,59}.

1.1.1.3 O papel da IL-1 β na hiperalgesia inflamatória

Diferentes tipos celulares incluindo macrófagos, monócitos e células gliais produzem IL-1 β que por sua vez induz a produção de outros mediadores inflamatórios⁶¹. Tem sido demonstrado que a IL-1 β está envolvida em vários aspectos de inflamação, tais como o recrutamento de células sanguíneas

brancas, febre, liberação de proteínas de fase aguda e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos⁶²⁻⁶⁴. A IL-1 β estimula a expressão da ciclooxigenase (COX-2) e a subsequente liberação de seus produtos, PGE⁶⁵⁻⁶⁷. O fato de, em última análise as PGE sensibilizarem o nociceptor⁶⁸⁻⁷⁰ sugere a IL-1 β como um importante mediador inflamatório hiperalgésico.

A IL-1 β foi a primeira citocina relatada mediar a nocicepção inflamatória em animais experimentais⁷¹. Foi mostrado que a injeção intraplantar de IL-1 β , mesmo em pequenas doses (pictogramas) produz hiperalgisia mecânica que depende da liberação de prostanóides, pois o pré-tratamento local com indometacina (inibidor de COX) bloqueou os seus efeitos⁷¹.

A administração de IL-1 β , quer no tecido periférico ou no sistema nervoso central (medula espinal) induz hiperalgisia que é prevenida pelo pré-tratamento com um antagonista para o receptor de IL-1 (IL-1ra) ou inibidor de COX, indicando que hiperalgisia induzida por IL-1 β é mediada pela ativação de receptores específicos de membrana e a subsequente síntese de PGE^{72,73}.

A participação de IL-1 β na indução de hiperalgisia inflamatória mediada por prostanóides foi também demonstrada em modelos de inflamação, tais como a administração local, de carragenina (Cg) ou lipopolissacarídeo (LPS)⁷¹. A hiperalgisia mecânica induzida por LPS ou Cg é parcialmente (50%) inibida pelo pré-tratamento local com anticorpo contra a IL-1 β ⁷⁴. Reforçando estes dados, resultados semelhantes foram obtidos no hiperalgisia mecânica induzida por Cg em ratos⁷⁵. Esta inibição parcial sugere que outra via nociceptiva além da IL-1 β / prostanóides está envolvida na hiperalgisia mecânica inflamatória induzida por Cg em ratos.

Interessante para o presente estudo, foi a demonstração da participação de IL-1 β por hiperalgisia mecânica e térmica induzida adjuvante de CFA. Neste modelo a IL-1 β induz a liberação de NGF, e anticorpo contra o NGF inibem a hiperalgisia induzida por CFA e IL-1 β . Além disso, IL-1ra inibiu a hiperalgisia mecânica e térmica induzida por CFA e IL-1 β , mas não por NGF^{76,77}.

Assim, há uma grande quantidade de dados na literatura demonstrando o papel da IL-1 β como um mediador hiperalgésico intermediário, principalmente nos tecidos periféricos. A partir de uma perspectiva terapêutica, estes dados

experimentais suportam o fato que IL-1 β é um alvo para controlar a dor inflamatória.

1.1.1.4 Citocinas anti-inflamatórias e hiperalgesia inflamatória

Durante o curso de uma inflamação Th1, citocinas pró- e anti-inflamatórias são produzidas e o seu equilíbrio determina a magnitude da resposta inflamatória. Para limitar as consequências deletérias da ação prolongada de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , a sua libertação é seguida pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, tais como interleucina-4 (IL-4), IL-10, Interleucina-13 (IL-13) e IL-1ra. Estas citocinas anti-inflamatórias modulam eventos inflamatórios e imunológicos que inibem a produção e ações das citocinas pró-inflamatórias⁶.

1.1.1.5 O papel de IL-10 na hiperalgesia inflamatória

A IL-10 foi a primeira citocina antihiperalgésica descrita, e é produzida por diversos tipos de células, tais como linfócitos, monócitos, macrófagos e mastócitos. Tem sido demonstrado que a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias. Foi mostrada ação imune supressora em ratos deficiente de IL-10 que desenvolveram artrite induzida por colágeno mais grave. Uma resposta semelhante foi observada em ratos tratados com anticorpo anti-IL-10⁷⁸⁻⁸⁰. Diferentemente, o tratamento com a IL-10 suprimiu significativamente a gravidade da artrite⁸¹.

O efeito antihiperalgésico de IL-10 também foi demonstrado no modelo de inflamação induzida por Cg. Uma única injeção local de IL-10 aboliu a hiperalgesia mecânica induzida pela administração de Cg, na pata traseira de ratos. Além disso, IL-10 inibiu a hiperalgesia induzida pela administração local de TNF- α , IL-1 β ou IL-6.

A hiperalgesia induzida por PGE₂ não foi inibida por IL-10, o que é explicado pela ação direta sensibilizadora da PGE₂ no nociceptor. No entanto, a IL-10 inibiu de forma dose dependente a hiperalgesia induzida pela bradicinina, em ratos, que parece ser dependente da liberação de citocinas. Os efeitos inibitórios da IL-10 na produção de citocinas pró-inflamatórias também inibe a produção de prostanóides. Assim, observou-se que a hiperalgesia induzida por IL-1 β , depende da produção de prostanóides, foi inibida por IL-10. Esta sugestão foi reforçada pelo fato de que a IL-10 aboliu a produção de PGE por células mononucleares sanguíneas, estimuladas com IL-1 β ⁸².

O efeito inibitório da IL-10 também foi demonstrado em ratos com hiperalgesia mecânica e térmica induzida por LPS. Neste modelo, o efeito antihiperalgésico de IL-10 foi atribuído à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, a liberação de TNF- α , IL-1 β e NGF foram inibidas por IL-10⁸³.

A liberação endógena de IL-10 pode também atuar como um down-regulador do processo inflamatório, porque a administração de anticorpos contra esta citocina, além de aumentar a resposta hiperalgésica, também aumentou outros eventos inflamatórios^{82,84,85}. Portanto, administração exógena ou terapias que aumentem a liberação endógena de IL-10 pode representar uma ferramenta benéfica e eficaz na redução da dor inflamatória.

1.1.2 Termalismo - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece e incentiva o uso de práticas tradicionais e terapias integrativas entre seus Estados membros. No Brasil tais práticas tiveram sua ascensão a partir das décadas de 1970. Começaram a ocorrer crescentes discussões, ora criticando, ora valorizando os métodos destas práticas. Atualmente essas práticas vêm ganhando destaque com sua implementação no SUS. Em 3 de Maio de 2006, foi aprovada a portaria nº 971 que defende a PNPIC no Sistema Único de Saúde. É definido então diretrizes, linhas de ações e responsabilidades para inclusão das Plantas

Medicinais/Fitoterapia, Homeopatia, Medicina Tradicional Chinesa/Acupuntura, Termalismo Social/ Crenoterapia e Medicina Antroposófica, como opções terapêuticas⁹.

No que se refere ao Termalismo Social e Crenoterapia, ou seja, na utilização das águas minerais e termominerais em saúde, sabe-se que a utilização das águas minerais como tratamento é conhecido desde a época do Império Grego, tendo sua primeira descrição científica por Heródoto (450 a.C.). Atualmente estudos científicos explicam nos termos científicos atuais a os tratamentos em saúde tradição que perduram entre as gerações. Entre as diretrizes da PNPIC, o incentivo a pesquisas em termalismo social e crenoterapia^{9,86} estão apresentados, conformando-se às justificativas do presente estudo.

1.1.3 Águas termominerais de Caldas da Imperatriz - SC

1.1.3.1 Contexto histórico

No Brasil, Caldas da Imperatriz SC, é reconhecida como a primeira estância termomineral. Em 1845, o Imperador Dom Pedro II e sua esposa Teresa Cristina, banharam-se com as águas do local. Em base de algum conhecimento popular, sobre os benefícios daquelas águas, a primeira ideia sobre a construção de um hospital em Caldas foi lançada pelo militar português João Vieira Tovar e Albuquerque, onde mandou um ofício nº 1 ao vice-rei, no dia 31 de janeiro de 1818. No documento o militar defendia os efeitos saudáveis que aquelas águas vinham proporcionando aos enfermos que nela se banhavam. Em resposta a carta, Dom João VI aprovou o projeto, reconhecendo aquelas águas como tratamento eficaz para várias doenças, e uso na reabilitação⁸⁷.

No governado de Antero de Brito, presidente da província de SC de 26 de junho de 1840 a 26 de dezembro de 1848, foi criado um projeto de lei para

iniciar as obras, que visava melhorias ao terreno onde o hospital deveria ser instalado. Para que o hospital tivesse uma grande credibilidade frente a população, Antero de Brito sugeriu que a Imperatriz, Teresa Cristina fosse titulada a protetora do Hospital de Caldas⁸⁸. No entanto, os problemas na administração e na estruturação do hospital, em 1876 levou a transferência da administração para o governo federal. Nesse momento, nasceu a ideia de criar-se um hotel e não mais um local onde tratassem apenas os pacientes⁸⁸. Parte das motivações que levaram o abandono da concretização de um hospital termal como nos moldes de Caldas da Rainha, em Portugal, derivou-se das avaliações físico-química da água que começava a ser possível e viável no Brasil. No verão de 1887 o médico Ismael da Rocha, em sua visita a Caldas da Imperatriz, realizou estudos sobre os elementos presentes daquelas águas. Ismael afirmou, que havia poucos minerais presentes. Dado a água ter sido constatada como oligomineral, o interesse em sua possibilidade diminuiu por esta prova científica, embora a tradição popular dos banhos para aliviar as dores e outros males naquele local permaneceu.

Somente entre 1928 e 1930, José Ferreira de Andrada Júnior, funcionário do Serviço Geológico e Mineralógico do Brasil relatou em visita para análise das características das águas de Caldas da Imperatriz a ocorrência de emanção do Tório (Th) nas emergências das fontes, associada à emanção do Rádio (Ra)⁸⁸. Nesta época, assim como ainda hoje pouco se sabia cientificamente sobre os benefícios para saúde proporcionado pelas características físico-químicas naturais desta fonte hidrotermal. A Tabela 1, apresenta as características químicas e a Tabela 2, apresenta as características físicas prováveis da fonte termal do Hotel Caldas da Imperatriz.

Tabela 1 – Elementos químicos encontrados na análise das fontes de águas termais do Hotel Caldas da Imperatriz (2013)

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

Fonte: Estudos in loco realizados pelo D.N.P.M. de M.M.E. Bol. Nº 285 e 286/Lamin de 12/06/2013.

Tabela 2 – Características Físico-químicas encontrados na análise das fontes de águas termais do Hotel Caldas da Imperatriz (2013)

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

Fonte: Estudos in loco realizados pelo D.N.P.M. de M.M.E. Bol. Nº 285 e 286/Lamin de 12/06/2013.

Atualmente em Caldas da Imperatriz turistas e moradores procuram as águas desta região por seus conhecidos efeitos terapêuticos, muito embora sabe-se que a maior procura nos hotéis da região seja derivada do turismo de lazer, e não por saúde. Ainda que, até o presente momento, não houveram comprovações científicas dos atributos terapêuticos das ATMs de Caldas da Imperatriz, a tradição do uso terapêutico destas águas permanece. No Hotel Caldas da Imperatriz, local onde foi construído para abrigar o Hospital Termal, os banhos termais são preconizados em placas na entrada das banheiras, indicando a duração entre 15 a 20 minutos. Considera-se que a temperatura média das banheiras de Caldas da Imperatriz, entre 34°C a 39°C, bem como o tempo preconizado entre 15 e 20 minutos, estejam ainda respaldados no Guia de Boas Práticas Termais do Sindicato Nacional dos Médicos das Estações Termais Marinas e Climáticas da França e também pelo Manual Técnico de Hidrologia médica e Hidroterapia do Ministério de Saúde e Consumo da Espanha. No Brasil embora haja uma Política de Práticas Integrativas e Complementares que incentivam a utilização desses tratamentos, no entanto, não há protocolos estabelecidos para os estabelecimentos e observatórios de Termalismo e Crenoterapia⁸⁹.

1.1.4 Tratamento da dor com ATM

Na maioria dos países europeus, os banhos em ATM ou balneoterapia (BT), terapia em spa e a hidroterapia são amplamente prescritos pelos médicos e preferidas pelos cidadãos europeus para o tratamento de dores crônicas⁹⁰. Dessas modalidades terapêuticas a que mais se assemelha as abordagens realizadas nas instâncias termominerais do Brasil é a BT que é definida como o uso de banhos (em banheiras ou piscinas) contendo água termomineral e/ou mineral a partir de fontes naturais ou poços perfurados. A BT por si só é difícil de estudar, uma vez que geralmente é parte da terapia total de spa. No entanto, foi possível comparar os efeitos da BT com as de água quente da torneira em estudos duplo-cegos na osteoartrite do joelho^{91,92} e na artrite

reumatóide⁹³. Em outros estudos controlados, mas não duplo-cegos, BT ambulatorial foi efetiva no alívio da dor em pacientes com dor crônica lombar⁹⁴⁻⁹⁶ e fibromialgia⁹⁷.

O mecanismo pelo qual a imersão em ATM alivia a dor, sobretudo em doenças inflamatórias, tem sido estudado, mas estão longe de serem totalmente compreendidos⁹⁸. Acredita-se que o alívio da dor pode ser promovido pela pressão e pela temperatura da água na pele, pois estímulos quentes podem influenciar o tônus muscular e a intensidade da dor, auxiliando na redução do espasmo muscular e aumentando o limiar doloroso⁹⁸. É de se esperar que os minerais presentes na água sejam absorvidos pela pele, mas há poucas evidências⁹⁹. Shani e colaboradores¹⁰⁰ observaram, um aumento da concentração sérica de bromo, rubídio, cálcio e zinco em pacientes com psoríase após banho no Mar Morto. Se estes minerais possuem qualquer efeito biológico ainda não é conhecido. Existem dados, no entanto, que o enxofre pode ser absorvido através da pele e pode ter efeito analgésico¹⁰¹⁻¹⁰³. Gutenbrunner e colaboradores descobriram que banhos de enxofre reduz a dor induzida por pressão ou temperatura, em ambos, indivíduos normais e pacientes com AR¹⁰³. Em um estudo utilizando o modelo de artrite induzida por CFA em ratos, foi observado redução no edema após banhos (repetidos) sulfurosos¹⁰⁴. O radônio é um gás que também penetra na pele e até mesmo pode ser inalado durante tratamento com banho de radônio. Esta substância pode ter efeitos anti-inflamatórios e analgésicos¹⁰⁵.

Um ponto importante a ser salientado é que várias abordagens têm sido utilizadas em todo o mundo utilizando ATM no tratamento de condições inflamatórias e que cada uma dessas águas possui uma soma de fatores que podem influenciar no resultado final. Existem espalhadas por todo o Brasil, como já mencionado, muitas fontes de ATM que as pessoas procuram para tratar condições inflamatórias. No entanto, dificilmente encontra-se fontes com as mesmas características. Assim, faz-se necessário estudos com cada uma delas a fim de determinar o potencial de cura destas fontes. Neste sentido, este estudo foi elaborado para verificar o potencial terapêutico da ATM de Santa Amaro da Imperatriz-SC.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da imersão diária em ATM de Santa Amaro da Imperatriz-SC na inflamação periférica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da imersão diária em ATM na hiperalgesia mecânica;

Analisar os efeitos da imersão diária em ATM no edema;

Verificar os efeitos da imersão diária em ATM nas concentrações de citocinas inflamatórias.

3. MÉTODOS

3.2 CONFLITO DE INTERESSE

Esta pesquisa não apresenta nenhum tipo de conflito de interesse.

3.3 TIPO DE PESQUISA

A presente pesquisa tem caráter experimental, utilizou um modelo pré-clínico e caracteriza-se como uma pesquisa básica¹⁰⁶.

3.3 ANIMAIS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Neurociência Experimental (LANEX) - Pedra Branca, Bloco I2, na Universidade do Sul de Santa Catarina. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, obtidos do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina, pesando entre 30 a 35 gramas. Os animais foram aclimatados a 22±2°C, tendo um ciclo claro/escuro de 12h (claro a partir das 06h:00min), com acesso a ração e água "*ad libitum*". Os animais foram homogeneamente distribuídos entre os grupos e aclimatados no laboratório, por pelo menos 1 hora antes dos experimentos e usados somente uma vez em cada experimento.

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA-UNISUL) sob o protocolo nº 16.009.4.01.IV. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia de Cuidados de Animais de Laboratório e Guia ético para a Investigações Experimentais da dor em animais conscientes¹⁰⁷.

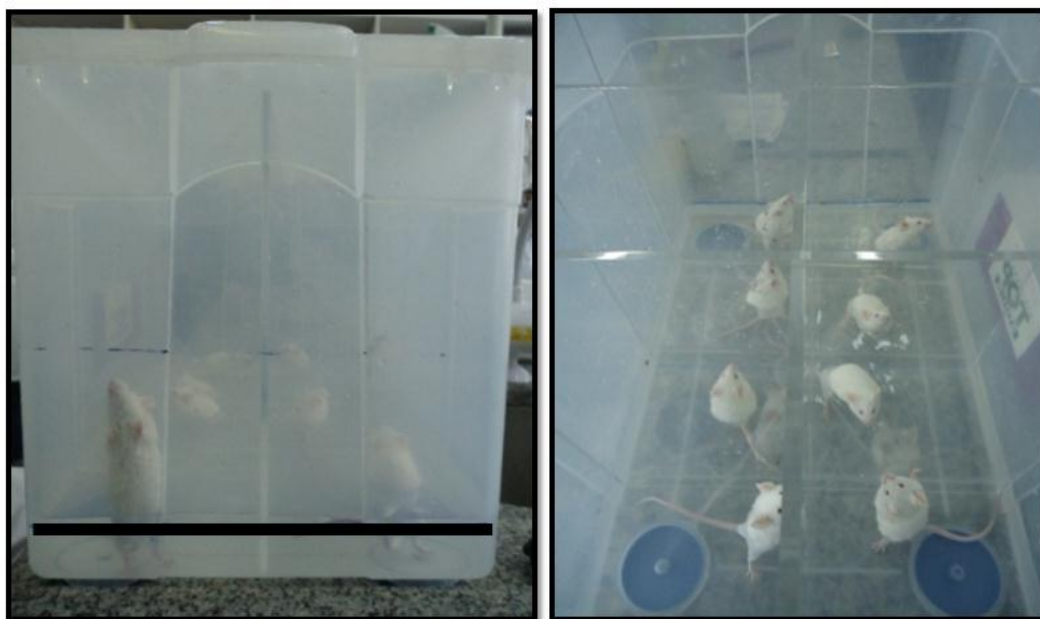
3.4 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA

O modelo de inflamação persistente foi induzido pelo adjuvante completo de Freund (CFA) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolvido em solução salina e Tween®80, resultando em uma concentração de 80% de CFA¹⁰⁸. Foi injetado 20 µl desta solução na pata direita de cada animal. Esta solução foi administrada para avaliar o possível efeito da imersão diária em ATM na inflamação periférica.

3.5 TRATAMENTOS COM ATM

A ATM foi coletada todos os dias (entre 10h:00-11h:00min), diretamente da fonte, na sua temperatura natural de 39°C, localizada dentro do Hotel Caldas da Imperatriz. A água foi armazenada em garrafas térmicas com capacidade de 5 litros e transportada até o LANEX para a realização dos experimentos. Para a realização dos tratamentos, uma caixa plástica com capacidade para 35 litros de água, medindo 540 x 390 x 325 mm, dividida com acrílicos, em oito compartimentos individuais de 170 x 110 mm cada um (figura 3). A caixa plástica era então preenchida com apenas 5 litros da ATM, uma quantidade suficiente para manter imerso o tornozelo dos animais, cobrindo a pata inflamada. A temperatura da água foi monitorada por um termômetro de laboratório permanecendo em torno de 35°C durante os tratamentos, nas vezes que houve redução da temperatura foi adicionado ATM com temperatura superior e assim manteve-se os 35°C. Em nenhum momento a ATM foi aquecida artificialmente. O grupo controle recebeu tratamento com água destilada à 25°C por 10 minutos. Neste estudo optou-se em submeter os animais do grupo controle a 10 minutos de imersão por que em estudo anterior publicado por nosso grupo este tempo com outras temperaturas foi o mais efetivo na redução da hiperalgesia mecânica⁴.

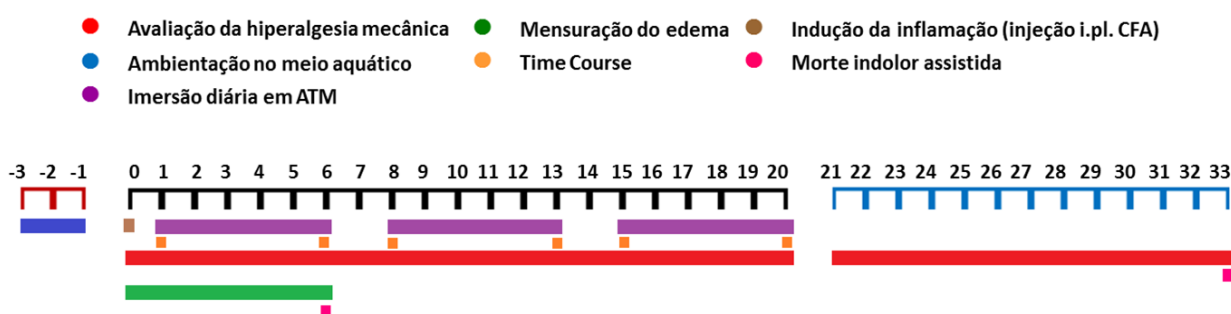
Figura 3 – Tratamento por imersão em ATM.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

O protocolo de tratamento foi realizado da seguinte maneira: Nos três primeiros dias que antecederam a terapia, os animais foram submetidos a 3 minutos de imersão, em água destilada (25°C). No quarto dia, diferentes grupos de animais foram submetidos a uma sessão de 3, 10 ou 30 minutos de imersão em ATM ou destilada, durante 21 dias exceto nos domingos (Figura 4)¹⁰⁹⁻¹¹².

Figura 4 – Desenho experimental



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Neste estudo foram utilizados grupos experimentais (n = 8 animais) distribuídos da seguinte forma:

Grupo 1: animais naive sem nenhum procedimento;

Grupo 2: Injeção de CFA + tratamento com água destilada a 25°C durante 10 minutos;

Grupo 3: Injeção de CFA + tratamento com termalismo a 35°C durante 3 minutos;

Grupo 4: Injeção de CFA + tratamento com termalismo a 35°C durante 10 minutos;

Grupo 5: Injeção de CFA + tratamento com termalismo a 35°C durante 30 minutos.

3.6 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de von Frey como previamente descrito¹¹³. A frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de von Frey (0,4 g) (VFH, Stoelting, Chicago, USA) foram os valores percentuais utilizados, como indicativo de resposta. No dia anterior a indução da dor inflamatória os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal. Apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta em torno de 20% foram selecionados.

O teste foi aplicado utilizando uma plataforma de (70 x 40 cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma¹¹⁴. O filamento foi aplicado na pata posterior direita^{39,115} (inflamada), atendendo alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando

as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal removia totalmente a pata da tela de apoio.

3.7 MENSURAÇÃO DO EDEMA NA PATA

Realizou-se uma avaliação basal, onde os animais não tiveram nenhum tipo de intervenção, e após a aplicação do CFA avaliou-se novamente, para mensurar a indução do processo inflamatório. Para avaliar o efeito da imersão diária em água termomineral sobre o edema na pata, o volume da pata posterior direita foi mensurado por meio de um pletismômetro (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Essas avaliações foram realizadas no 0, 1º, 2º, 3º, 4º, 5º e 6º dia após a injeção de CFA, 30 minutos após a imersão diária em ATM. Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata em relação ao volume basal. Além disso, no 6º dia, 30 minutos após os tratamentos os animais foram sacrificados e as patas direita e esquerda foram retiradas e pesadas em uma balança analítica (modelo AUX, Biosystems, São José dos Pinhais, PR, Brasil)

3.8 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO LIGADO A ENZIMA (ELISA)

Seis dias após a injeção de CFA, amostras das patas direitas e da medula espinal (segmento L3-L6) dos animais submetidos a injeção de CFA, foram retiradas e as concentrações de citocinas pelo método de ELISA. As amostras de tecido das patas foram homogeneizadas com salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de 100 fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 10 mM), aprotinina (2 ng/ml), cloreto de benzetônio (0,1 mM). O homogenato foi transferido para tubos Eppendorf, centrifugados a 3000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi estocado a -80°C para posterior análises^{116,117}. A

quantidade de proteínas foi medida no sobrenadante pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão. Um volume de 100 µl da amostra foi utilizado para mensurar a concentração de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), interleucina-1 beta (IL-1β) e interleucina-10 (IL-10). O conteúdo protéico total foi mensurado do sobrenadante pelo método de Bradford, usando kits de ELISA para citocinas (R&D Systems®, Minneapolis, Minnesota, EUA), para camundongos de acordo com as instruções do fabricante. Os valores obtidos foram estimados por meio da interpolação de uma curva padrão, utilizando-se ensaio colorimétrico, medido à 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um leitor de placas de ELISA (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China). Assim todos os resultados foram expressos em picogramas de citocinas^{116,117}.

3.9 MORTE INDOLOR ASSISTIDA (MIA)

Após os experimentos os animais foram eutanasiados obedecendo as disposições da Resolução nº. 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), de 20/06/2002, e que ocorreram de forma indolor e assistida por Médico Veterinário responsável pelos animais no Campus Pedra Branca. Foram, realizadas por meio da administração de uma mistura de xilazina e cetamina, sendo injetado o volume de 1 mL por via intraperitoneal em cada camundongo. Sandro Melim Sgrott, Matrícula na UNISUL-7517 e CRMV 03844-SC foi o Médico Veterinário responsável pelo procedimento de MIA.

3.10 FÁRMACOS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas: Adjuvante completo de Freud (CFA) (Sigma Chemical CO., St Luis, Missouri, Estados Unidos). cetamina (Vetbrands Limited, Brasil); xilazina (Carlier SA, Barcelona, Espanha). Níveis de citocinas foram avaliados utilizando-se kits ELISA R & D Systems. Finalmente, tween, PMSF, EDTA, Aprotinina A e cloreto de benzametônio (Estados Unidos Biológicas, MA, EUA) foram usados nos ensaios para a determinação das citocinas.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no programa GraphPad Prism versão 6.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados apresentaram distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Desta forma, os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram comparados usando a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de *Student Newman Keuls* ou Bonferroni, quando necessários. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

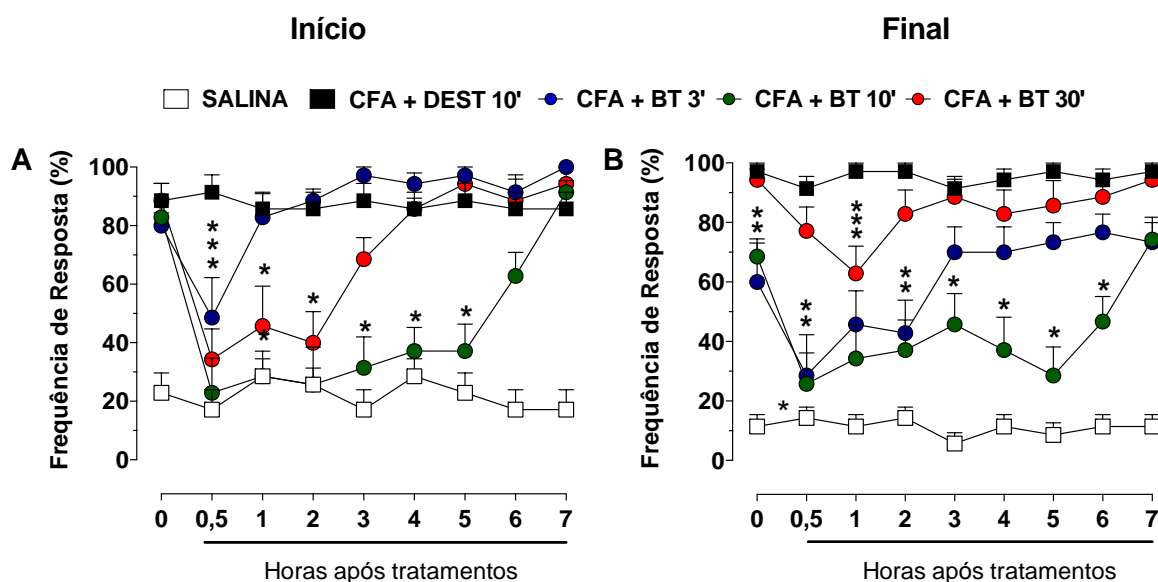
4.1 EFEITO DA IMERSÃO DIÁRIA EM ATM SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados apresentados na figura 5 mostram o efeito da imersão diária em ATM na primeira semana de tratamento. Vinte e quatro horas após a injeção i.pl. de CFA observou-se um aumento na frequência de retirada da pata ao estímulo mecânico (média de $91,4 \pm 6,0\%$ de resposta, $p < 0,05$), comportamento sugestivo de hiperalgesia, quando comparados ao grupo que recebeu injeção i.pl. de salina (média de $17,1 \pm 6,8\%$ de resposta, $p < 0,05$). No entanto, após os respectivos tratamentos por diferentes tempos de imersão se observou na avaliação dos decursos temporais que o grupo tratado por 3 minutos de imersão (BT 3') apresentou efeito antihiperalgésico por reduzir a porcentagem de frequência de resposta de retirada da pata (média de $48,5 \pm 14\%$ de resposta, $p < 0,05$) somente 30 minutos após o tratamento. Os animais tratados por 30 minutos de imersão (BT 30') apresentaram efeito antihiperalgésico em 30 minutos (média de $34,3 \pm 10,4\%$ de resposta, $p < 0,05$), 1 hora (média de $45,7 \pm 13,6\%$ de resposta, $p < 0,05$) e 2 horas (média de $40 \pm 10,7\%$ de resposta, $p < 0,05$) após tratamento. No entanto, o grupo de animais submetidos apenas por 10 minutos (BT 10') surpreendentemente apresentou efeito antihiperalgésico em 30 minutos (média de $22,9 \pm 12\%$ de resposta, $p < 0,05$), 1 hora (média de $28,6 \pm 8,6\%$ de resposta, $p < 0,05$), 2 hora (média de $25,7 \pm 12,9\%$ de resposta, $p < 0,05$), 3 hora (média de $31,4 \pm 10,6\%$ de resposta, $p < 0,05$), 4 horas (média de $37,1 \pm 8,0\%$ de resposta, $p < 0,05$) e 5 horas (média de $37,1 \pm 9,2\%$ de resposta, $p < 0,05$) após o término da imersão (Figura 5A).

A figura 5B mostra os resultados da avaliação do decurso temporal realizada no final da primeira semana de tratamento (6º dia após injeção i.pl. de CFA). Observou-se que os grupo BT 3' (média de $60,0 \pm 13,1\%$, $p < 0,05$) e BT

10' (média de $68,6 \pm 6,0\%$, $p < 0,05$) apresentaram redução da hiperalgesia ($p < 0,05$) já na avaliação basal. Após os tratamentos diários observou-se que o grupo BT 3' apresentou efeito antihiperálgico em 30 minutos (média de $28,6 \pm 13,7\%$, $p < 0,05$), 1 hora (média de $45,7 \pm 11,3\%$, $p < 0,05$) e 2 horas (média de $42,9 \pm 11,7\%$, $p < 0,05$) após tratamento. O grupo BT 30' apresentou efeito antihiperálgico apenas na primeira hora ($62,9 \pm 9,2\%$, $p < 0,05$) após tratamento. O grupo BT 10' continuou mostrando-se ser o melhor tempo de tratamento aumentando seu tempo de efeito antihiperálgico; assim apresentando efeito em: 30 minutos (média de $25,7 \pm 10,4\%$, $p < 0,05$), 1 hora (média de $34,3 \pm 11,3\%$, $p < 0,05$), 2 horas (média de $37,1 \pm 10,2\%$, $p < 0,05$), 3 horas (média de $45,7 \pm 10,4\%$, $p < 0,05$), 4 horas (média de $37,1 \pm 11,2\%$, $p < 0,05$), 5 horas (média de $28,6 \pm 9,6\%$, $p < 0,05$) e 6 horas (média de $46,7 \pm 8,4\%$, $p < 0,05$) após o término da imersão (Figura 5A).

Figura 5 - Efeito da imersão diária em ATM sobre a hiperalgesia mecânica de origem inflamatória na primeira semana de tratamento.



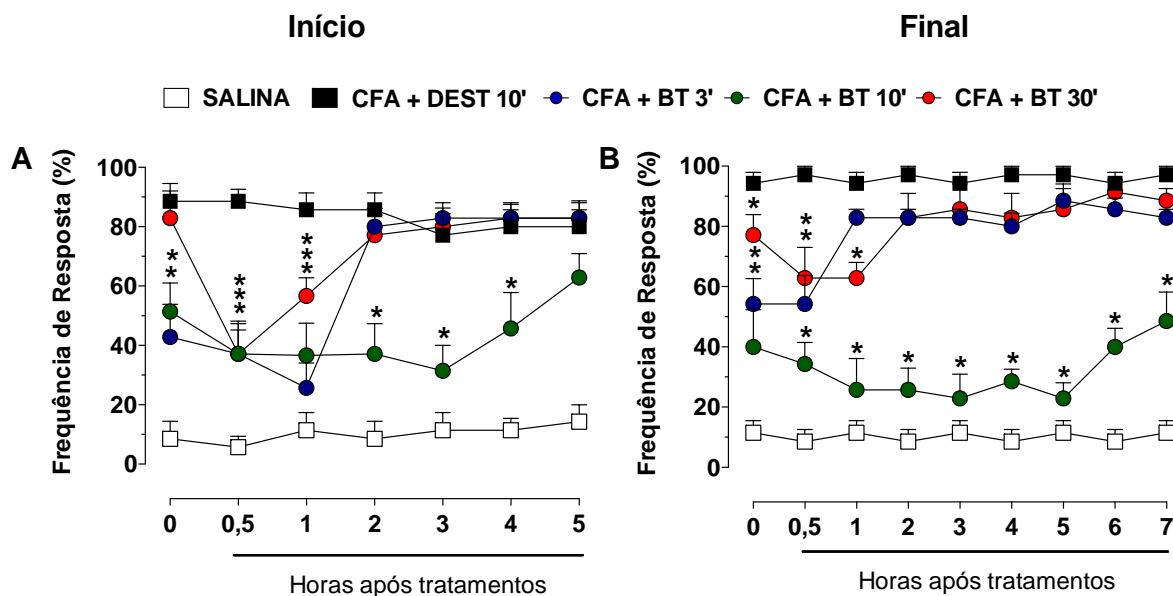
Legenda: Avaliação do decurso temporal do efeito da imersão diária em ATM no início e final da primeira semana de tratamento. Efeito da imersão diária em ATM em diferentes tempos de tratamento, sobre a hiperalgesia mecânica induzida por CFA em camundongos. Decurso

temporal do efeito da aplicação da imersão diária em água ATM no início (painel A) e final (painel B) da primeira semana de tratamento. Os dados são expressados como média \pm E.P.M., $n = 8$ animais. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CFA (20 μ l/pata). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. BT 3': imersão diária em água ATM por 3 minutos. BT 10': imersão diária em ATM por 10 minutos. BT 30': imersão diária em ATM por 30 minutos. 0: resposta de retirada basal. Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Na segunda semana (8º dia após injeção i.p. de CFA), interessantemente os animais tratados com BT 3' (média de $54,3 \pm 8,4\%$, $p < 0,05$) e BT 10' (média de $51,4 \pm 9,6\%$, $p < 0,05$) de imersão, apresentaram uma diminuição significativa da hiperalgisia mecânica na avaliação basal. Após o tratamento diário se observou no decurso temporal realizado (Figura 6) que o grupo BT 3' apresentou efeito antihiperalgésico em 30 minutos (média de $37,4 \pm 10,2\%$, $p < 0,05$), 1 hora (média de $25,7 \pm 8,4\%$, $p < 0,05$) após a imersão. Os animais BT 30' apresentaram efeito antihiperalgésico em 30 minutos (média de $37,1 \pm 8,1\%$, $p < 0,05$) e 1 hora (média de $56,7 \pm 6,1\%$, $p < 0,05$) após tratamento. No entanto, o grupo BT 10' surpreendentemente apresentou efeito antihiperalgésico em 30 minutos (média de $37,1 \pm 11,1\%$, $p < 0,05$), 1 hora (média de $36,7 \pm 10,9\%$, $p < 0,05$), 2 horas (média de $37,1 \pm 10,2\%$, $p < 0,05$), 3 horas (média de $31,4 \pm 8,6\%$, $p < 0,05$) e 4 horas (média de $45,7 \pm 12,1\%$, $p < 0,05$) após o término da imersão (Figura 6A).

No final da segunda semana (13º dia) se observou na avaliação basal um efeito antihiperalgésico nos grupos tratados com ATM. O efeito foi mais acentuado no grupo BT 10' ($40,0 \pm 12,3\%$, $p < 0,05$). O grupo BT 3' apresentou efeito antihiperalgésico ($54,3 \pm 9,5\%$, $p < 0,05$) em 30 minutos, após a imersão; Já o grupo BT 30' teve efeito antihiperalgésico em 30 minutos ($62,9 \pm 10,2\%$, $p < 0,05$) e 1 hora ($62,9 \pm 5,2\%$, $p < 0,05$), após imersão; O grupo BT 10' continuou produziu efeito antihiperalgésico em: 30 minutos (média de $34,3 \pm 7,2\%$, $p < 0,05$), 1 hora (média de $25,7 \pm 10,4\%$, $p < 0,05$), 2 horas (média de $25,7 \pm 7,2\%$, $p < 0,05$), 3 horas (média de $22,9 \pm 8,1\%$, $p < 0,05$), 4 horas (média de $28,6 \pm 4,0\%$, $p < 0,05$), 5 horas (média de $22,9 \pm 5,2\%$, $p < 0,05$), 6 horas (média de $40,0 \pm 6,2\%$, $p < 0,05$) e 7 horas (média de $48,6 \pm 9,6\%$) após o término da imersão (Figura 6A).

Figura 6 - Efeito da imersão diária em ATM sobre a hiperalgesia mecânica de origem inflamatória na segunda semana de tratamento.



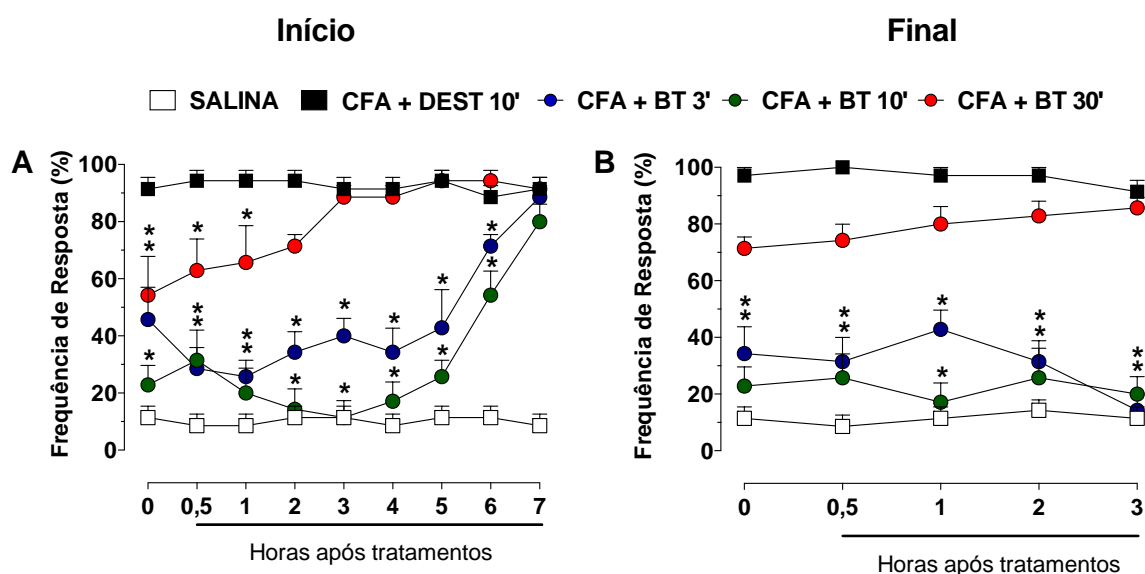
Legenda: Avaliação do decurso temporal do efeito da imersão diária em ATM no início e final da segunda semana de tratamento. Efeito da imersão diária em ATM em diferentes tempos de tratamento sobre a hiperalgesia mecânica induzida por CFA em camundongos. Decurso temporal do efeito da aplicação da imersão diária em ATM no início (painéis A) e final (painéis B) da segunda semana de tratamento. Os dados são expressados como média \pm E.P.M., $n = 8$ animais. $*p < 0,05$ quando comparado com o grupo CFA (20 μ l/pata). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. BT 3': imersão diária em ATM por 3 minutos. BT 10': imersão diária em ATM por 10 minutos. BT 30': imersão diária em ATM por 30 minutos. 0: resposta de retirada basal. Fonte: Elaborado pela autora (2016).

No início da terceira semana de tratamento se observou um efeito acumulativo da resposta antihiperalgésica em todos os grupos tratados já na resposta basal. O grupo BT 3' apresentou efeito antihiperalgésico em 30 minutos (média de $28,6 \pm 7,4\%$, $p < 0,05$), 1 hora (média de $25,7 \pm 5,8\%$, $p < 0,05$), 2 horas (média de $34,3 \pm 7,2\%$, $p < 0,05$), 3 horas (média de $40,0 \pm 6,2\%$, $p < 0,05$), 4 horas (média de $34,3 \pm 8,4\%$, $p < 0,05$), 5 horas (média de $42,9 \pm 13,4\%$, $p < 0,05$) e 6 horas (média de $71,4 \pm 4,0\%$, $p < 0,05$), após a imersão. O grupo BT 30' apresentou efeito antihiperalgésico em 30 minutos (média de $62,9 \pm 11,1\%$, $p < 0,05$) e 1 hora (média de $65,7 \pm 12,9\%$, $p < 0,05$), após imersão. Já o grupo BT 10' apresentou efeito antihiperalgésico em 30

minutos (média de $31,4 \pm 10,6\%$, $p < 0,05$), 1 hora (média de $20,0 \pm 8,7\%$, $p < 0,05$), 2 horas (média de $14,3 \pm 7,2\%$, $p < 0,05$), 3 horas (média de $11,4 \pm 5,9\%$, $p < 0,05$), 4 horas (média de $17,4 \pm 6,8\%$, $p < 0,05$), 5 horas (média de $25,7 \pm 5,7\%$, $p < 0,05$) e 6 horas (média de $54,3 \pm 8,4\%$, $p < 0,05$), após imersão.

No 20º dia de tratamento nota-se no decurso temporal realizado, os grupos BT 3' e BT 10' continuam apresentando efeito antihiperálgésico já na resposta basal. Os grupos BT 3' e o BT 10' mantiveram seus efeitos antihiperálgésico em todos os tempos avaliados.

Figura 7 - Efeito da imersão diária em ATM sobre a hiperálgesia mecânica de origem inflamatória na terceira semana de tratamento.

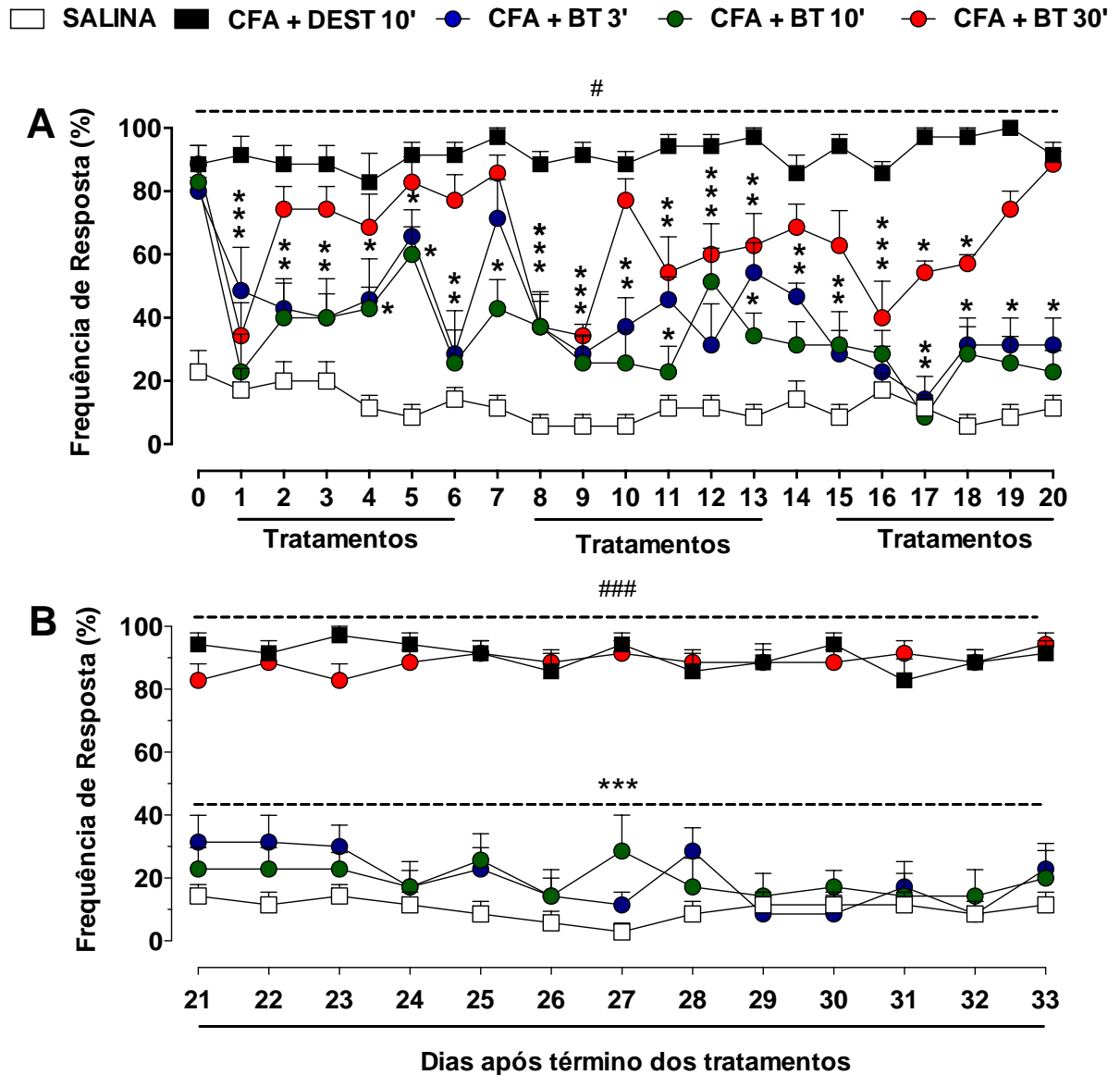


Legenda: Avaliação do decurso temporal do efeito da imersão diária em ATM no início e final da terceira semana de tratamento. Efeito da imersão diária em ATM em diferentes tempos de tratamento sobre a hiperálgesia mecânica induzida por CFA em camundongos. Decurso temporal do efeito da aplicação da imersão diária em ATM no início (painéis A) e final (painéis B) da terceira semana de tratamento. Os dados são expressados como média \pm E.P.M., $n = 8$ animais. $*p < 0,05$ quando comparado com o grupo CFA ($20 \mu\text{l/pata}$). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. BT 3': imersão diária em ATM por 3 minutos. BT 10': imersão diária em ATM por 10 minutos. BT 30': imersão diária em água ATM por 30 minutos. 0: resposta de retirada basal. Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Os resultados apresentados na figura 8A mostram o efeito da imersão diária em ATM durante 20 dias, 30 minutos após o tratamento diário. Observou-se que no 20º dia após a injeção i.pl. de CFA os animais ainda apresentavam um aumento na frequência de retirada da pata ao estímulo mecânico (média de $91,7 \pm 1,0\%$ de resposta, $p < 0,05$), comportamento sugestivo de hiperalgesia, quando comparados ao grupo que recebeu injeção i.pl. de salina (média de $12,0 \pm 1,1\%$ de resposta, $p < 0,05$).

Na figura 8B observou-se que no 33º dia após a injeção i.pl. de CFA os animais mantiveram-se com o aumento na frequência de retirada da pata ao estímulo mecânico (média de $90,8 \pm 1,2\%$ de resposta, $p < 0,05$), comportamento sugestivo de hiperalgesia, quando comparados ao grupo que recebeu injeção i.pl. de salina (média de $10,1 \pm 1,0\%$ de resposta, $p < 0,05$). Na avaliação da hiperalgesia mecânica por até duas semanas após o término do tratamento, os grupos BT 3' e BT 10' apresentaram efeito antihiperálgico ($19,4 \pm 2,5\%$, $p < 0,05$).

Figura 8 - Efeito do tratamento repetido por meio da imersão diária em ATM sobre a hiperalgesia mecânica de origem inflamatória.

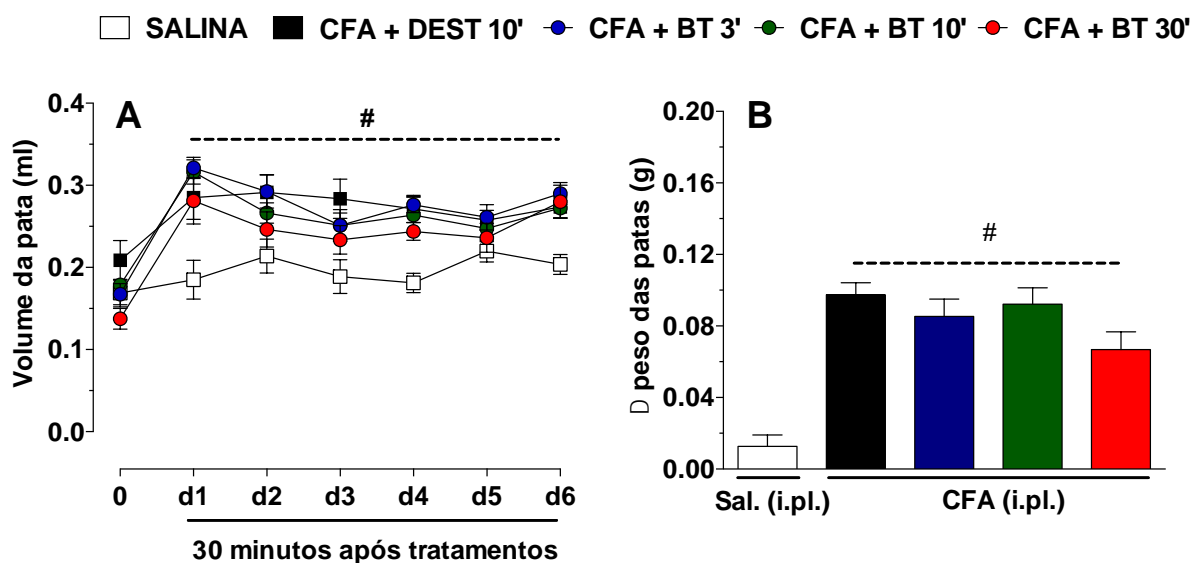


Legenda: Avaliação do efeito da imersão diária em ATM por três semanas de tratamento. Imersão diária em ATM em diferentes tempos de tratamento sobre a hiperalgesia mecânica induzida por CFA em camundongos. Os dados são expressados como média \pm E.P.M., $n = 8$ animais. $*p < 0,05$ quando comparado com o grupo CFA (20 μ l/pata). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. BT 3': imersão diária em ATM por 3 minutos. BT 10': imersão diária em ATM por 10 minutos. BT 30': imersão diária em ATM por 30 minutos. 0: resposta de retirada basal. Fonte: Elaborado pela autora (2016).

4.2 EFEITO DA IMERSÃO DIÁRIA EM ATM SOBRE O EDEMA DA PATA

Os resultados apresentados na figura 9A demonstram que a injeção i.pl. de CFA induziu edema na pata ipsilateral a injeção nos camundongos, observados entre o 1º ao 6º dia após o procedimento, quando comparados com o grupo salina (20 µl/pata). Além disso, pode-se observar que o tratamento de imersão diária em ATM não reduziu significativamente ($p>0,05$) o edema na pata, nos dias avaliados, quando comparados com o grupo CFA. Os dados apresentados na figura 9B demonstram que não houve diferença significativa ($p>0,05$) no peso da pata no 6º dia, em nenhum dos grupos de tratamento (BT 3', BT 10' ou BT 30').

Figura 9 - Efeito da imersão diária em ATM no edema de pata.



Legenda: Efeito da imersão diária em ATM sobre o edema de pata. Efeito da imersão diária em ATM em diferentes tempos de tratamento sobre o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. Avaliação em diferentes dias de imersão diária em ATM (painel A). Mensuração do peso da pata direita 30 minutos após o 6º dia de tratamento (painel B). Diferença do peso das patas 30 minutos após o 6º dia de tratamento (painel C) Os dados são expressos como média ± E.P.M., n = 8 animais. * $p<0,05$ quando comparado com o grupo CFA (20 µl/pata). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. BT 3': imersão diária em ATM durante 3 minutos. BT 10': imersão diária em ATM

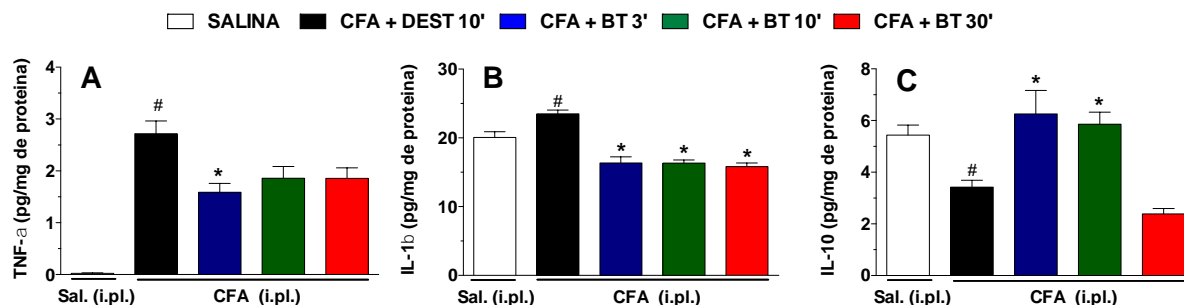
durante 10 minutos. BT 30': imersão diária em ATM durante 30 minutos. D: dia. 0: volume basal. Fonte: Elaborado pela autora (2016).

4.3 EFEITO DA IMERSÃO DIÁRIA EM ATM SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS DA PATA

Os resultados demonstrados nas figura 10 (A e B) mostram que no 7º dia após a injeção de CFA na pata direita dos camundongos, o grupo CFA (controle) apresentou maiores ($p<0,05$) concentrações de TNF- α e IL-1 β na pata ipsilateral quando comparado com o grupo salina. No entanto, observou-se que somente o grupo BT 3', apresentou menor ($p<0,05$) concentração de TNF- α quando comparado com o grupo CFA (controle). Na análise das concentrações de IL1- β , todos os grupos tratados (BT 3', BT 10' e BT 30') apresentaram menores ($p<0,05$) concentrações de IL1- β após a injeção i.pl. de CFA quando comparados com o grupo CFA (controle).

A figura 10C demonstra que com a injeção de CFA na pata dos camundongos, o grupo CFA (controle) apresentou menor ($p<0,05$) concentração de IL-10 quando comparado com o grupo salina. Interessantemente, nos grupos BT 3' e BT 10' observou-se maiores ($p<0,05$) concentrações de IL-10 na pata, quando comparado com o grupo CFA (controle).

Figura 10 - Efeito da imersão diária em ATM sobre as concentrações de citocinas na pata.



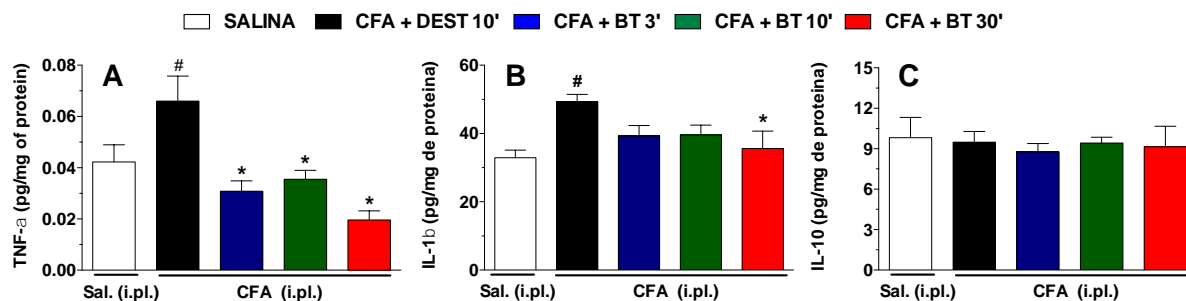
Legenda: Dosagens de citocinas pró- e anti-inflamatórias de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA, analisadas no 6º dia após injeção: TNF- α (painel A), IL-1 β (painel B) e IL-10 (painel C). Os dados são expressados como a média \pm E.P.M., $n = 8$ animais. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina; * $p < 0,05$ quando comparado com os grupos controle CFA. Foi utilizada ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student Newman-Keuls, quando apropriado. Fonte: Elaborado pela autora (2016).

4.4 EFEITO DA IMERSÃO DIÁRIA EM ATM SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS DA MEDULA ESPINAL

Os resultados demonstrados nas figuras 11 A e B mostram que no 7º dia após a injeção de CFA na pata direita dos camundongos, o grupo CFA (controle) apresentou maiores ($p < 0,05$) concentrações de TNF- α e IL-1 β na medula espinal quando comparado com o grupo salina. Na análise das concentrações de TNF- α , somente o grupo BT 30', apresentou menor ($p < 0,05$) concentração de TNF- α quando comparado com o grupo CFA (controle). No entanto, observou-se que todos os grupos tratados (BT 3', BT 10' e BT 30'), apresentaram menores ($p < 0,05$) concentrações de IL1- β quando comparado com o grupo CFA (controle).

A figura 11C demonstra que com a injeção de CFA na pata dos camundongos, o grupo CFA (controle) apresentou menor ($p < 0,05$) concentração de IL-10 quando comparado com o grupo salina. No entanto, observou-se que todos os grupos tratados (BT 3', BT 10' e BT 30'), não apresentaram aumento das concentrações de IL-10 quando comparado com o grupo CFA (controle).

Figura 11 - Efeito da imersão diária em ATM sobre as concentrações de citocinas na medula espinal.



Legenda: Dosagens de citocinas pró- e anti-inflamatórias de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA, analisadas no 6º dia após injeção: TNF- α (painel A), IL-1 β (painel B) e IL-10 (painel C). Os dados são expressados como a média \pm E.P.M., n = 8 animais. [#] $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina; ^{*} $p < 0,05$ quando comparado com os grupos controle CFA. Foi utilizada ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student Newman-Keuls, quando apropriado. Fonte: Elaborado pela autora (2016).

5. DISCUSSÃO

A utilização de ATM naturais com finalidade de prevenção, tratamento ou reabilitação de doenças é definida como BT. A BT tem sido usada por centenas de anos no tratamento de doenças inflamatórias musculoesqueléticas¹¹⁸. No entanto, ainda restam dúvidas a respeito de sua efetividade, uma vez que os estudos clínicos disponíveis apresentam várias limitações. Muitas vezes, estas limitações são viés existentes difíceis de controlar. Por exemplo: nos estudos com a BT geralmente os indivíduos são tratados em Spas que existem dentro de estâncias ou termas localizadas em lugares privilegiados com natureza exuberante, toda essa natureza já exerce efeito benéfico à saúde. Além disso, a interação e socialização dos indivíduos nos Spas pode criar um efeito positivo interferindo no curso da doença. Por essas razões os efeitos observados em indivíduos que se tratam com BT não podem ser explicados totalmente pelos efeitos da imersão em ATM¹¹⁸.

Neste sentido, idealizou-se realizar uma pesquisa com a BT sem a interferência do ambiente “Spa” a fim de verificar os efeitos reais da imersão em ATM na hiperalgesia mecânica inflamatória. Assim, utilizando-se de uma abordagem pré-clínica se escolheu camundongos como ferramenta biológica e o CFA como agente flogístico. Com estes recursos induziu-se experimentalmente uma condição inflamatória crônica muito similar a encontrada nas principais condições musculoesqueléticas crônicas que acometem pacientes; como a osteoartrite, artrite reumatoide, fibromialgia, espondilite anquilose, e que são amenizadas pelo tratamento com BT¹¹⁹⁻¹²¹.

Assim, o presente estudo aponta evidências de que a BT (terapia por imersão em ATM) reduz a resposta inflamatória em um modelo animal de dor inflamatória periférica persistente. Os achados mais importantes deste trabalho foram que: (1) a imersão diária em ATM por diferentes tempos reduz a hiperalgesia mecânica na pata dos animais, sendo este efeito dependente do tempo de imersão; (2) o tratamento diário por imersão diária em ATM induz efeito somatório, evidenciado pelo prolongamento da resposta antihiperálgica nas avaliações dos decursos temporais; (3) a imersão diária em ATM

restabelece a resposta sensorial dos animais mesmo após o final dos tratamentos; (4) a imersão diária em ATM não altera o edema na pata dos animais com inflamação; Além disso, os resultados encontrados aqui apontam que os tratamentos por imersão em ATM reduzem a hiperalgesia por (5) reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias e aumentar as concentrações de citocinas anti-inflamatórias na pata dos animais com inflamação e; (6) e também por reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias na medula espinal dos camundongos com inflamação periférica.

O uso da BT em doenças musculoesqueléticas, dermatológicas, ginecológicas e doenças vasculares periféricas especialmente na Europa e outras partes do mundo são datados desde a antiguidade¹²². O tipo mais comum da aplicação da BT é a imersão em ATM que pode ser realizada pela imersão do corpo inteiro ou apenas partes do corpo¹²¹. Embora o efeito analgésico da BT já esteja bem estabelecido sendo evidenciado por vários estudos clínicos em várias condições musculoesqueléticas inflamatória incluindo fibromialgia, osteoartrite de joelho, espondilite anquilosante^{121,123-126}, poucos estudos foram idealizados a fim de analisar efetivamente protocolos de tratamentos e o mecanismo de ação. O presente estudo, pelo menos ao nosso conhecimento, é o primeiro a analisar diferentes protocolos (tempo de imersão) e relatar o efeito antihiperalgésico da imersão em ATM em animais.

A antihiperalgesia mecânica causada pela imersão em ATM observada aqui, também pode ser explicada como o resultado da soma dos efeitos térmicos, mecânicos e químicos da BT. O calor da água termal pode influenciar no processo inflamatório e produzir analgesia de quatro maneiras: 1) vasodilatação; 2) ativação do mecanismo da comporta da dor; 3) aumento das concentrações de beta-endorfinas e controle inibitório da dor e; 4) relaxamento muscular. Tem sido mostrado que a vasodilatação superficial causada pelo calor superficial causa aumento do fluxo sanguíneo e reduz a estase e o espasmo vascular. Como resultado, mediadores pró-nociceptivos (espécies reativas ao oxigênio e citocinas pró-inflamatórias) são drenados do local da inflamação. O estímulo térmico também causa ativação do mecanismo da comporta da dor que juntamente com a liberação de opióides endógenos exerce um efeito analgésico direto. Por fim, o calor também causa relaxamento

muscular e sedação. A água mineral pode ainda se adaptar as partes do corpo imersas e exercer forças hidro-mecânicas. Assim ela pode aumentar a mobilidade das articulações e o tônus muscular¹²⁷. Além disso, esse estímulo pode influenciar os fluídos corporais a migrarem de lugar, drenando das extremidades para o tronco causando hemodiluição e diurese.

Em relação ao efeito químico da balneoterapia, explica-se pela absorção dos oligominerais da água mineralizada através da pele, modulando assim o sistema imunológico. Sugere-se que os elementos minerais se acumulam nas várias camadas da pele formando um depósito que libera substâncias minerais para a circulação incrementalmente que participam conseqüentemente de ações sistêmicas^{128,129}. Poucos estudos foram realizados analisando o efeito químico da balneoterapia, por esse motivo esse efeito é menos claro do que os efeitos térmico e mecânico.

No presente estudo, utilizou-se a ATM de Santo Amaro da Imperatriz-SC. Essa água possui características físico-químicas única (descritas nas tabelas 1 e 2, em sessão prévia). Isso quer dizer que dificilmente sejam encontradas, em outras fontes de ATM nacionais e talvez internacionais, as mesmas características físico-químicas da água de Santo Amaro da Imperatriz-SC. Neste sentido, encontra-se grande dificuldade em fazer comparações diretas dos resultados obtidos no presente estudo com a literatura atual. No entanto, na literatura encontra-se estudos realizados com ATM que apresentam minerais, oligominerais, radiatividade, etc. que também estão presentes na água de Santo Amaro da Imperatriz-SC, características físico químicas que podem explicar em parte o efeito observado. Neste sentido, um estudo realizado pela Universidade de Gaziantep na Turquia, nas termas de Uğurlu que contém alguns minerais e oligominerais em comum com a ATM de Santo Amaro da Imperatriz-SC (Sódio [Na], Potássio [K], Magnésio [Mg], Cálcio [Ca], Fluoretos [F], Nitrato [NO₃], Sulfato [SO₄], bicarbonato [HCO₃]) verificou resultados promissores da BT. Este estudo foi realizado também com o tratamento pautado na imersão diária, durante 3 semanas e com água a temperatura de 34,8°C, a exemplo do presente estudo. O estudo teve como objetivo verificar os efeitos da BT sobre o quadro doloroso em mulheres com fibromialgia comparando com educação (conhecimento sobre a doença). Os

autores concluíram que ambos tratamentos foram efetivos em reduzir a dor nas pacientes com fibromialgia, no entanto o grupo tratado com BT apresentou melhores efeitos a longo prazo¹¹⁹.

Outro interessante estudo foi realizado pelo Hospital de Pesquisa em Fisioterapia de Ancara na também na Turquia, que com base na avaliação da dor e capacidade funcional (escala análoga visual [EVA], questionário de incapacidade de Oswestry, questionário de qualidade de vida SF-36) avaliou a efetividade da BT associada a fisioterapia versus fisioterapia apenas em pacientes com dor lombar crônica. A ATM usada continha Na, F, Cl e HCO₃ com um total de 2,595 mg/L de solutos minerais, com uma temperatura original de 78°C, sendo resfriada e usada nos pacientes a 38°C. Os pacientes receberam tratamentos diários de 20 minutos por três semanas, a exemplo do presente estudo. Os autores encontraram que a adição da BT à fisioterapia é mais efetiva na redução da dor e aumento da capacidade funcional em pacientes com dor lombar crônica quando comparada a fisioterapia realizada isoladamente¹²¹.

Estudos com osteoartrite também foram realizados¹²⁰. Nguyen e Dougados (1997) realizaram um estudo pela Universidade de René Descartes, Paris, em um Spa na cidade de Vichy, França. Os autores analisaram o efeito a longo prazo dos tratamentos por três semanas de BT comparados com fisioterapia convencional em pacientes com osteoartrite em diferentes regiões do corpo, como: joelho, quadril e coluna vertebral lombar. O estudo foi do tipo controlado, randomizado e prospectivo. Este estudo mostrou que seis meses após o término dos tratamentos (BT ou fisioterapia), somente o grupo BT ainda apresentava redução da dor, melhora funcional, qualidade de vida e menor ingestão de fármacos analgésicos em pacientes com osteoartrite.

Os três estudos discutidos, apesar de serem realizados em humanos apresentam desenhos bem similares ao presente estudo. Assim, eles fortalecem os achados por demonstrar o potencial analgésico da BT. O fato que eles encontraram redução da dor a longo prazo, vem de encontro aos resultados do presente estudo em que se encontrou efeito antihiperalgésico em até duas semanas após o fim dos tratamentos. Este efeito também pode estar

associado a redução de citocinas pró-inflamatórias na pata (periferia) e na medula espinal, discutido adiante.

Após o estabelecimento deste efeito antihiperálgico da BT, se formulou a seguinte pergunta, como a BT pode aliviar a hiperálgia mecânica inflamatória? Para responder esta pergunta é importante primeiro entender a fisiopatologia que está por trás deste processo. O aumento da sensibilidade à dor é uma característica comum da resposta inflamatória e ocorre após a lesão tecidual. A sensibilização periférica é desencadeada pela ativação do fator de transcrição κ B (NF κ B) relacionado a mediadores pró-inflamatórias, incluindo as citocinas TNF- α e IL-1 β ^{6,7,75}. Além do papel na resposta inflamatória, estes mediadores podem atuar diretamente sobre os seus receptores ou alvos expressos nos terminais periféricos dos nociceptores reduzindo o limiar da sensorial, levando à dor inflamatória e hiperálgia¹³⁰. Além disso, eles induzem o recrutamento de neutrófilos, que conduz ao aumento adicional de mediadores hiperálgicos, tais como a prostaglandina E2 (PGE2)^{75,131}. Por conseguinte, a inibição da produção de mediadores hiperálgicos é um alvo importante para o controle da dor¹³².

É importante notar, que em várias doenças a hiperálgia inflamatória é o principal sintoma responsável pela redução da qualidade de vida¹³³, que muitas vezes é ainda mais reduzida pelos efeitos secundários que ocorrem com a utilização crônica de corticosteroides e fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais¹³⁴. Neste estudo, mostrou-se os efeitos antihiperálgicos da BT e seu mecanismo de ação, apresentando como alvo as citocinas pró- e anti-inflamatórias presentes na periferia e na medula espinal.

Há vários modelos padronizados em animais utilizados para testar novos agentes terapêuticos para o tratamento da dor inflamatória crônica. Modelos comuns de osteoartrite em animais são induzidos experimentalmente por CFA⁵⁰ ou mono-iodoacetato⁵². Clinicamente, a dor inflamatória crônica, particularmente devida a osteoartrite, representa o maior público que busca alívio da dor por terapias analgésicas. No modelo animal utilizando o CFA a resposta nociceptiva (dor/hiperálgia) pode ser normalmente medida avaliando a hipersensibilidade mecânica e/ou térmica da pata posterior⁵⁰. Além disso, o potencial anti-inflamatório de qualquer abordagem terapêutica pode ser

avaliado pela quantificação de edema da pata e de citocinas pró-inflamatórias em sítios de modulação da dor¹³⁵.

Tem sido mostrado que a injeção i.p. de CFA em camundongo produz hiperalgesia mecânica persistente acompanhada pelo aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatória (TNF- α e IL-1 β) tanto na periferia (pata) quanto na medula espinal¹¹⁷. Portanto, a ação dessas citocinas pró-inflamatória parece exercer importante papel na hiperalgesia mecânica induzida por CFA. Do mesmo como descrito na literatura, no presente estudo, observou-se que a injeção i.pl. de CFA aumentou as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β na pata e medula espinal, no 6º dia após a sua administração. Além disto, observou-se que somente o grupo BT 3' diminuiu significativamente as concentrações de TNF- α na pata, porém, as concentrações de IL-1 β (pata) diminuíram significativamente em todo os grupos de tratamento. Na medula espinal, os grupos BT 3' e BT 10' diminuíram significativamente as concentrações de TNF- α , enquanto que somente o grupo BT 10' diminuiu as concentrações de IL-1 β . O presente estudo também mostrou que a injeção i.pl. de CFA diminuiu as concentrações das citocinas anti-inflamatórias, IL-10 na pata no 6º dia após a sua administração. No entanto os grupos BT 3' e BT 10' aumentaram as concentrações dessa citocina.

Interessantemente, os tratamentos com BT reduziram as concentrações de citocinas pró-inflamatórias e aumentaram as concentrações de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória. Assim, o efeito antihiperalgésico da BT observado neste estudo está provavelmente associado a essa influencia que a BT exerce sobre as concentrações destas citocinas. No entanto, para determinar se este efeito é mediado por uma inibição direta da síntese e liberação das citocinas pró-inflamatórias ou por inibição da ação delas por inibição de seus respectivos receptores pela liberação de outras substâncias endógenas antihiperalgésica, ainda precisa ser investigado.

No presente estudo também se observou que todos os tempos de imersão utilizados não influenciaram no edema da pata. Inicialmente, esperava-se que a imersão em ATM pudesse reduzir o edema, em função de suas propriedades físico-químicas. No entanto, não foi observada mudanças no edema de pata. É importante destacar, por outro lado, que os tempos dos

tratamentos utilizados não aumentaram o edema, pois outra hipótese seria o aumento da inflamação pela influência da temperatura de 35°C sobre o tecido inflamado. Isso corrobora que resultados publicados em outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, no mesmo modelo animal de inflamação periférica, onde se avaliou os efeitos da imersão em água da torneira em uma temperatura de 35°C. Também não se observou alteração do volume da pata dos animais imersas em água aquecida em nenhum dos tempos⁴.

Por fim, um ponto importante a ser destacado é que diferentes parâmetros têm sido utilizados em todo o mundo com ATM com características diferentes no tratamento de condições inflamatórias. Assim, a abordagem experimental empregada no presente estudo pode ser uma alternativa para que seja possível avaliar e mesmo comparar o efeito de águas de diferentes fontes sem interferência do ambiente Spa sobre o processamento da dor. Neste sentido, o presente estudo apresenta evidências de que a BT realizada com ATM de Santo Amaro da Imperatriz-SC reduz a hiperalgesia mecânica inflamatória, mas não alterou o edema, em um modelo animal de dor inflamatória periférica persistente.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados no presente estudo, conclui-se que:

1) a imersão diária em ATM é efetiva na redução da hiperalgisia mecânica de origem inflamatória, sendo este efeito dependente do tempo de imersão, somatório e que persiste a longo prazo;

2) a imersão diária em ATM não altera o edema induzido pelo CFA, na pata dos animais;

3) A redução das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (pata e medula espinal) e o aumento das concentrações de citocinas anti-inflamatórias na pata dos animais com inflamação parece ser um mecanismo pelo qual a ATM exerce seu efeito antihiperalgésico;

Como perspectivas futuras, sugere-se que sejam realizados estudos da mesma natureza do presente estudo e com análises de parâmetros de estresse oxidativo, pois a literatura aponta também para um potencial efeito antioxidante das ATM. Além disso, os achados do estudo apontam para utilização de novos tempos de imersão, no entanto, necessita-se a validação clínica destes parâmetros.

REFERÊNCIAS

1. Willman A, Petzäll K, Östberg AL, Hall-Lord ML. The psycho-social dimension of pain and health-related quality of life in the oldest old. *Scand J Caring Sci.* 2013;27(3):534-40.
2. Ferreira SH. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol.* 1972;240:200–3.
3. Ferreira SH. Peripheral analgesia: mechanism of the analgesic action of aspirin-like drugs and opiate-antagonists. *Br J Clin Pharmacol.* 1980;10 Suppl 2:237S-245S.
4. Martins DF, Brito RN, Stramosk J, Batisti AP, Madeira F, Turnes BL, et al. Pheripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. *J Neurosci Res.* 2015;93(1):157-66.
5. Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radical Biol Med.* 2011;51(5):951-66.
6. Verri WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther.* 2006;112(1):116-38.
7. Verri WAJ, Cunha TM, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Cytokine inhibitors and pain control. *Rev Bras Reumatol.* 2007;47(5):341–53.
8. Portalsaude.saude.gov [Internet]. Brasil: Instrução normativa 004/2010 [atualizado em 2012 Fev 17; acesso em 2012 mar 20]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos /pdf/PNPIC.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf).
9. Coffito.org [Internet]. Brasil: RESOLUÇÃO COFFITO nº. 380, de 3 de novembro de 2010 [atualizado em 2016 Jun 26; acesso em 2016 Jun 27]. Disponível em: <http://www.coffito.org.br/>.
10. Martins C. Tabuleiro das Águas: resgate histórico e cultural de Santo Amaro da

- Imperatriz. Florianópolis, Recriar/Unisul, 2001
11. Quintela MM. Saberes e práticas termais: uma perspectiva comparada em Portugal (Termas de S. Pedro do Sul) e no Brasil (Caldas da Imperatriz). Manguinhos, Rio de Janeiro. 2004;.11 (1):239-60.
 12. G1. Site de notícias [Internet]. Palhoça: Globo; [acesso em 2015 set 2]. Disponível em: <http://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/2015/07/sus-oferece-tratamento-para-dores-cronicas-em-estancia-termal-em-sc.html>
 13. Schmid-Schönbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:93-131.
 14. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-75.
 15. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010;140:771–6.
 16. Xanthos DN, Sandkühler J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(1):43-53.
 17. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65(2):S140-6.
 18. Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell.* 2010;19;140(6): 935-50.
 19. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med.* 2011;17:1371–80.
 20. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(11):2563-82.
 21. Hague M, Shenker N. How to investigate: Chronic pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;28(6):860-74.
 22. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001;413(6852):203-10.

23. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211(1):39-50.
24. Willis WD Jr. The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. *Brain Res Rev*. 2007;55(2):297-313.
25. Rexed B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*. 1954;100(2):297-379.
26. Benn SC, Perrelet D, Kato AC, Scholz J, Decosterd I, Mannion RJ, et al. Hsp27 upregulation and phosphorylation is required for injured sensory and motor neuron survival. *Neuron*. 2002;36(1):45-56.
27. Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. Innocuous, not noxious, input activates PKC γ interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J Neurosci*. 2008;28(32):7936-44.
28. Osikowicz M, Mika J, Przewlocka B. The glutamatergic system as a target for neuropathic pain relief. *Exp Physiol*. 2013;98(2):372-84.
29. Basbaum A, Jessell T. The perception of pain. In: Kandel E, Schwartz J, Jessell T, editors. *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-Hill; 2000. pp. 472–491.
30. Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*. 2005;9(4):463-84.
31. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84.
32. Splettstoesser WD, Schuff-Werner P. Oxidative stress in phagocytes—the enemy within. *Microsc Res Tech*. 2002;57(6):441-55.
33. Carraway MS, Welty-Wolf KE, Miller DL, Ortel TL, Idell S, Ghio AJ, et al. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(9):1200-9.

34. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*. 2001;85(3):342-50.
35. Cotran R, Kumar Z, Robbins SL. *Patologia Clínica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
36. Culig Z. Proinflammatory cytokine interleukin-6 in prostate carcinogenesis. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2(3):231-8.
37. Aderem A, Smith KD. Systems approach to dissecting immunity and inflammation. *Semin Immunol*. 2004;16(1):55-67.
38. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci*. 2002;5:1062-7.
39. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008;137(3):473-7.
40. Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 2010;120(11):3742-44.
41. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139:267–84.
42. Gold MS, Levine JD, Correa AM. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci*. 1998;18:10345–55.
43. Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci*. 1999;19:2181–6.
44. Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):533-48.
45. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl JvMed*. 2011;365:2205–19.
46. Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, van den Berg WB. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in

- driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62:647–57.
47. Boettger MK, Hensellek S, Richter F, Gajda M, Stöckigt R, Segond von Banchet G, et al. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2368–78.
48. Inglis JJ, Nissim A, Less DM, Hunt S, Chernajovsky Y, Kidd BL. The differential contribution of tumor necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2005 ;7:R807-R16.
49. DeLeo JA, Colburn RW, Nichols M, Malhotra A. Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J Interferon Cytokine Res.* 1996;16:695–700.
50. Sommer C, Schmidt C, George A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol.* 1998;151(1):138–42.
51. Schaible HG. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(5):470.
52. Segond von Banchet G, Boettger MK, Fischer N, Gajda M, Bräuer R, Schaible HG. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor-alpha-dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain.* 2009;145(1):151–59.
53. McMahon SB, Malcangio M. Current challenges in glia-pain biology. *Neuron.* 2009;64(1):46–54.
54. Boyle DL, Jones TL, Hammaker D, Svensson CI, Rosengren S, Albani S, et al. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. *PLoS Med.* 2006;3:e338.
55. Boettger MK, Weber K, Grossmann D, Gajda M, Bauer R, Bär KJ, et al. Spinal TNF-alpha neutralization reduces peripheral inflammation and hyperalgesia and suppresses autonomic responses in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(5):1308–18.
56. Richter F, Natura G, Loeser S, Schmidt K, Viisanen H, Schaible H-G. Tumor necrosis factor (TNF) causes persistent sensitization of joint nociceptors o

- mechanical stimuli in rats. *Arthritis Rheum.* 2010;62(12):3806–14.
57. Jin X, Gereau RW. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci.* 2006;26(1):246–55.
58. Oprea A, Kress M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci.* 2000;20(16):6289–93.
59. Phillips K, Clauw DJ. Central pain mechanisms in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2013;65:291–302.
60. König C, Zharsky M, Möller C, Schaible H-G, Ebersberger A. Involvement of peripheral and spinal tumor necrosis factor α (TNF α) in spinal Cord hyperexcitability during knee joint inflammation in rat. *Arthritis Rheum.* 2014;66:599–609.
61. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol.* 1998;16(5-6):457-99.
62. Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *Surv Immunol Res.* 1984;3(1):29–33.
63. Goldblum SE, Yoneda K, Cohen DA, McClain CJ. Provocation of pulmonary vascular endothelial injury in rabbits by human recombinant interleukin-1 beta. *Infect Immun.* 1988;56(9):2255–63.
64. Moser R, Schleiffenbaum B, Groscurth P, Fehr J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J Clin Invest.* 1989;83(2):444–55.
65. Bernheim HA, Gilbert TM, Stitt JT. Prostaglandin E levels in third ventricular cerebrospinal fluid of rabbits during fever and changes in body temperature. *J Physiol.* 1980;301:69–78.
66. Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, Gross MA, Anderson L, Weiner RS. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J Clin Invest.* 1986;77(6):1857–63.

67. Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest.* 1994;93(3): 1095–101.

68. Handwerker HO. Influences of algogenic substances and prostaglandins on the discharges of unmyelinated cutaneous nerve fibers identified as nociceptors. In J. J. Bonica, & D. Albe-Fessard (Eds.), *Adv Pain Res Ther* vol. 1 (pp. 41–45). New York: Raven Press. (1976).

69. Ferreira SH, Nakamura M. I- Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins.* 1979a;18(2):179–90.

70. Ferreira SH, Nakamura M. II- Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. *Prostaglandins.* 1979b;18(2):191–200.

71. Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin- 1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nat.* 2002;334(6184):698–700

72. Oka T, Aou S, Hori T. Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta induces hyperalgesia in rats. *Brain Res.* 1993;624(1–2):61–8.

73. Hori T, Oka T, Hosoi M, Aou S. Pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E₂ in the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840:269–81.

74. Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1992;107(3):660–4.

75. Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(5):1755–60.

76. Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1995;115(7):1265-75.

77. Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol*. 1997;121(3):417–24.
78. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991;147(11):3815–22.
79. Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Lincoln PM, Burdick MD, Kunkel SL. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2868–76.
80. Johansson AC, Hansson AS, Nandakumar KS, Backlund J, Holmdahl R. IL-10-deficient B10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protected from arthritis induced with antitype II collagen antibodies. *J Immunol*. 2001;15;167(6):3505–12.
81. Tanaka Y, Otsuka T, Hotokebuchi T, Miyahara H, Nakashima H, Kuga S, et al. Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice. *Inflamm Res*. 1996;45(6):283–88.
82. Poole S, Cunha FQ, Selkirk S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br J Pharmacol*. 1995;115(4):684–8.
83. Kanaan SA, Poole S, Saade NE, Jabbur S, Safieh-Garabedian B. Interleukin-10 reduces the endotoxin-induced hyperalgesia in mice. *J Neuroimmunol*. 1998;86(2):142–150.
84. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med*. 2002;30(1):S58–S63.
85. Vale ML, Marques JB, Moreira CA, Rocha FA, Ferreira SH, Poole S, et al. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(1):102–8.
86. Barros NF, Siegel P, Simoni C. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: passos para o pluralismo na saúde. *Caderno de Saúde Pública*. [Internet]. 2007 Dez [acesso em 2015 Nov 24]; 23(12): [3066-9]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v23n12/29.pdf>

87. Torres VN. Histórico do Uso e Ações Medicamentosas das Águas Minerais Termais na Saúde no Brasil. 7ª Jornada técnico-científica de “Medio Ambiente Subterráneo y Sostenibilidad” –Ambiente, seguridad y salud. [Internet].2013 [acesso em 2014 Maio]. Disponível em:<http://cerena.ist.utl.pt/masysnet/scmeetings/7aJornada_Actas/Brasil%20Portugal%201.pdf
88. Franco AC. [Internet] São Paulo: Águas fundam cidades: A formação de Estâncias Hidrominerais no Brasil no início do Século XX. Seminário de História da Cidade e do Urbanismo. [Internet] 2004 [acesso em 2014 Maio]. Disponível em: <<http://www.anpur.org.br/revista/rbeur/index.php/shcu/article/view/995/970>
89. Quintela, MM. [Internet] Coimbra: Cura Termal: Entre as Práticas “Populares” e os saberes “Científicos”. Portugal: Universidade de Coimbra. [Internet] 2014 [Acesso em: maio de 2014] Disponível em: <<http://www.ces.uc.pt/lab2004/inscricao/pdfs/painel37/MariaManuelQuintela.pdf>>
90. Bender T, Karagülle Z, Bálint GP, Gutenbrunner C, Bálint PV, Sukenik S. Hydrotherapy, balneotherapy, and spa treatment in pain management. *Rheumatol Int.* 2005;25(3):220–4.
91. Szucs L, Ratko I, Lesko T, Szoor I, Genti G, Balint G. Double-blind trial on the effectiveness of the Puspokladany thermal water on arthrosis of the knee-joints. *J R Soc Health.* 1989;109(1):7–9.
92. Kovacs I, Bender T. The therapeutic effects of Cserkeszolo thermal water in osteoarthritis of the knee: a Double blind, controlled, follow-up study. *Rheumatol Int.* 2002;21(6):218–21.
93. Sukenik S, Neumann L, Buskila D, Kleiner-Baumgarten A, Zimlichman S, Horowitz J. Dead Sea bath salts for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1990;8(4):353–7.
94. Konrad K, Tatrai T, Hunka A, Vereckei E, Korondi I. Controlled trial of balneotherapy in treatment of low back pain. *Ann Rheum Dis.* 1992;51:820–2.
95. Guillemin F, Constant F, Collin JF, Boulange M. Short and long-term effect of spa therapy in chronic low back pain. *Br J Rheumatol.* 1994;33:148–51.

96. Constant F, Collin JF, Guillemin F, Boulange. Effectiveness of spa therapy in chronic low back pain: a randomized clinical trial. *J Rheumatol*. 1995;22:1315–20.
97. Evcik D, Kızılay B, Gokcen E. The effects of balneotherapy on fibromyalgia patients. *Rheumatol Int*. 2002;22(2):56–9.
98. Annegret F, Thomas F. Long-term benefits of radon spa therapy in rheumatic diseases: results of the randomised, multi-centre IMuRa trial. *Rheumatol Int*. 2013;33(11):2839-50.
99. O'Hare JP, Heywood A, Dodds P, Corral RJM, Dieppe P. Water immersion in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1984;23:117–8.
100. Shani J, Barak S, Levi D, Ram M, Schachner ER, Schlesinger T, et al. Skin penetration of minerals in psoriatics and guinea-pigs bathing in hypertonic salt solutions. *Pharmacol Res Commun*. 1985;17(6):501-12.
101. Andrejew SV, Selenskaja VS. Das Verhalten des in den Körper aus dem Sulfidbad eindringenden Schwefels. In: Pratzel HG, Bühring M, Evers A (eds) *Schwefel in der Medizin*. Demeter, Grafelfing. 1991 pp 35–41.
102. Pratzel HG, Aigner UM, Weinert D, Limbach B. Zur analgetischen Wirksamkeit eines Schwefelmoorbades bei weichteilreumatischen Beschwerden. Eine randomisierte Doppelblindstudie. *Phys Rehab Kur Med*. 1992;2:92–97.
103. Gutenbrunner C, Kopetzki K, Neues-Lahusen M, Gehrke A. Wirkungen natürlicher thermoindifferenter Schwefelbäder - der auf Hautdurchblutung und Schmerzempfindlichkeit bei Gesunden und Patienten mit chronischer Polyarthrit. *Akt Reumatol*. 1999;24(4):117–23.
104. Karagülle MZ, Tuğlu ZN, Aslan O, Basak E, Mutlu A. Effects of thermal sulphur bath cure on adjuvant arthritic rats. *Phys Rehab Kur Med*. 1996;6:53–7
105. Joöckel H. Praktische Erfahrungen mit der Radontherapie. In: Pratzel HG, Deetjen P (eds) *Radon in der Kurortmedizin*. Geretsried:ISMH. 1997;84–91.
106. Rey L. *Planejar e redigir trabalhos científicos*. 2. ed. São Paulo: E. Blücher, 2000.

107. Zimmernann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.
108. Meotti FC, Missau FC, Ferreira J, Pizzolatti MG, Mizuzaki C, Nogueira CW, et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. *Biochem Pharmacol*. 2006;15;72(12):1707-13.
109. Guide des bonnes pratiques thermales. syndicat national des médecins des stations thermales, marines et climatiques de France. *Press therm climat* 2004 141:101-143.
110. Hernández-Torres A , Cuenca E, Ramón JR , Casado A , E López-Fernández E. Duración mínima del tratamiento balneario con aguas bicarbonatadas sulfatadas para conseguir un efecto antioxidante en personas mayores de 65 años. *Ver Esp de Geriat*. 2004;39(3):166–73.
111. Li X, Runze S, Bing W, Jie G, Linfu Z, Yugang Z, et al. 21-day Balneotherapy Improves Cardiopulmonary Function and Physical Capacity of Pilots. *Journal of Physical Therapy Sci*. 2013;25(1):109-12.
112. Tatjana ER, Mihajlo S. Balneotherapy in Treatment of Spastic Upper Limb after Stroke. *Med Arch*. 2015;69(1):31–33.
113. Tjølsen A, Hole K. Animal Models of Analgesia. *The Pharmacology of Pain*, v.130/l., Berlin: Springer-verlag. 1997. p. 1-20.
114. Wall PD, Melzack R. *Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1999.
115. Fox CD, Berger D, Fine PG. A position statement from the American Pain Society. Glenview: American Pain Society, 2000.
116. Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LG, et al. *Neuroscience*. 2011;194:337-48.
117. Martins DF, Turnes BL, Cidral-Filho FJ, Bobinski F, Rosas RF, Danielski LG, et al. Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. *Neuroscience*. 2016;324:485-95.

118. Nasermoaddeli A, Kagamimori S. Balneotherapy in medicine: a review. *Environ Health Prev Med.* 2005;10(4):171-9.
119. Koçyiğit BF, Gür A, Altındağ Ö, Akyol A, Gürsoy S. Comparison of education and balneotherapy efficacy in patients with fibromyalgia syndrome: A randomized, controlled clinical study. *Agri.* 2016;28(2):72-8.
120. Nguyen M, Revel M, Dougados M. Prolonged effects of 3 week therapy in a spa resort on lumbar spine, knee and hip osteoarthritis: follow-up after 6 months. A randomized controlled trial. *Br J Rheumatol.* 1997;36(1):77-81.
121. Onat ŞŞ, Taşoğlu Ö, Güneri FD, Özişler Z, Safer VB, Özgirgin N. The effectiveness of balneotherapy in chronic low back pain. *Clin Rheumatol.* 2014;33 (10): 1509-15.
122. Bender T, Bálint G, Prohászka Z, Géher P, Tefner IK. Evidence-based hydro- and balneotherapy in Hungary--a systematic review and meta-analysis. *Int J Biometeorol.* 2014;58(3):311-23.
123. Ablin JN, Häuser W, Buskila D. Spa treatment (balneotherapy) for fibromyalgia—a qualitative-narrative review and a historical perspective. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:
124. Gaál J, Varga J, Szekanecz Z, Kurkó J, Ficzer A, Bodolay E et al (2008) Balneotherapy in elderly patients: effect on pain from de- generative knee and spine conditions and on quality of life. *Isr Med Assoc J.* 2008;10(5):365-9.
125. Ciprian L, Lo Nigro A, Rizzo M, Gava A, Ramonda R, Punzi L et al. The effects of combined spa therapy and rehabilitation on patients with ankylosing spondylitis being treated with TNF inhib- itors. *Rheumatol Int.* 2013;33(1):241-5.
126. Altan L, Bingöl U, Aslan M, Yurtkuran M. The effect of balneotherapy on patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol.* 2006;35(4):283-9.
127. Lange U, Muller-Ladner U, Schmidt KL. Balneotherapy in rheumatic diseases—an overview of novel and known aspects. *Rheumatol Int.* 2006;26(6):497-9.
128. Nasermoaddeli A, Kagamimori S. Balneotherapy in medicine: a review. *Environ Health Prev Med.* 2005;10(4):171-9

129. Koçyiğit H, Aydemir Ö, Fişek G et al (1995) The reliability and validity of Turkish version of Short form 36 (SF 36). *J Drug Treat* 12: 102–106
130. Obreja O, Rathee PK, Lips KS, Distler C, Kress M. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB J* 2002;16:1497–1503.
131. Urban MO, Gebhart GF. Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:7687–7692.
132. Dinarello CA: Interleukin 1 as mediator of the acute-phase response. *Surv Immunol Res*. 1984;3:29-33.
133. Torrance GW. Utility approach to measuring health-related quality of life. *J Chronic Dis*. 1987;40:593-603.
134. Manson SC, Brown RE, Cerulli A, Vidaurre CF. The cumulative burden of oral corticosteroid side effects and the economic implications of steroid use. *Respir Med*. 2009;103: 975–994.
135. Levy L. Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci*. 1969;8:601–606.