



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FERNANDA BELLE

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DOR NEUROPÁTICA E
NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA EM
CAMUNDONGOS: ESTUDO DO SISTEMA OPIOIDE E SUA RELAÇÃO COM O
SISTEMA IMUNOLÓGICO**

Palhoça

2022

FERNANDA BELLE

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DOR NEUROPÁTICA E
NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA EM
CAMUNDONGOS: ESTUDO DO SISTEMA OPIOIDE E SUA RELAÇÃO COM
O SISTEMA IMUNOLÓGICO**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

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

Orientadora: Prof. Franciane Bobinski, Dra.

Palhoça
2022

B37 Belle, Fernanda, 1989 -

Efeitos do exercício físico na dor neuropática e neuroinflamação induzida pela lesão nervosa periférica em camundongos : estudo do sistema opioide e sua relação com o sistema imunológico / Fernanda Belle. – 2022.

71 f. : il. color. ; 30 cm

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

Orientação: Prof.^a Franciane Bobinski

1. Dor neuropática. 2. Exercícios físicos. 3. Citocinas. 4. Opióides. 5. Tronco encefálico. 6. Córtex pré-frontal. I. Bobinski, Franciane. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.0472

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Efeitos do exercício físico na dor neuropática e neuroinflamação induzida pela lesão nervosa periférica em camundongos: estudo do sistema opioide e sua relação com o sistema imunológico

FERNANDA BELLE

AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 28 de abril de 2022.

Doutora Franciane Bobinski (Orientador) _____ *Franciane Bobinski*



Documento assinado digitalmente

Morgana Duarte da Silva

Data: 08/11/2022 13:55:35-0300

CPF: ***.394.119-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Doutora Morgana Duarte da Silva (Avaliador externo – UFSC) _____

Doutor Daniel Fernandes Martins (Avaliador interno) _____ 

Documento assinado digitalmente

DANIEL FERNANDES MARTINS

Data: 28/10/2022 14:25:33-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Gislaine Tezza Rezin

Professora Doutora Gislaine Tezza Rezin

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNISUL**

AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer a Deus e Nossa Senhora, por guiarem e vigiarem toda a trajetória da minha vida. Nada é mais forte que a fé, ela nos move e nos sustenta.

Em especial agradeço ao Carlos, meu companheiro de vida. Você sempre foi meu maior apoiador, muitas vezes deixando seus sonhos de lado para que eu pudesse realizar os meus. Você é cuidado, afago, cumplicidade, ternura e amor.

Agradeço aos meus pais Agostinho e Marli por me ensinarem que através da educação conseguimos conquistar enormes vitórias e pela sua dedicação e esforço para que eu pudesse estudar e chegar até aqui. À minha irmã Ethiene que é minha conversa diária, minha mão estendida, minha cúmplice e minha dupla para todo o sempre. À minha sogra Maria José, ao Mário e meus cunhados Marília e Lyo vocês são o apoio, o suporte, a diversão e o alento. Agradeço as minhas sobrinhas Isis, Maya, Lya e ao meu sobrinho Levi, que me inspiram e entusiasmam a ser cada dia melhor, vocês são a alegria da minha vida. Ao meu sogro Fernandão, que diariamente liga e faz diminuir a distância, obrigada por todo seu afeto. Ao meu primo Diogo que sempre foi meu incentivador para esse projeto e sempre esteve disposto a me ouvir e ajudar, thank you for everything. Sou grata ainda aos meus filhos de quatro patas, Marolinha (in memoriam), Nino e Gigi, por todo carinho e por estarem sempre a minha volta, principalmente enquanto assistia as aulas, para estudar, para escrever, vocês foram essenciais nesse processo. Agradeço ainda a toda minha família que sempre rezou e torceu por mim e a minha Terapeuta Renata que além de seu trabalho excepcional, me acompanhou por todo esse período e com muito zelo trazendo alívio e segurança nessa caminhada.

Agradeço aos membros da minha banca, professora Dra. Morgana Duarte da Silva e Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins que aceitaram prontamente o convite de ler e avaliar minha dissertação, tenho certeza que suas contribuições serão de enorme valia para esse projeto.

Sobretudo, agradeço a você, minha querida orientadora Franciane, que me tirou da zona de conforto, revolucionou e expandiu o meu saber. Com seu jeito delicado, gentil, atencioso e muito paciente me fez crescer. Te agradeço infinitamente, não há palavras para descrever o prazer e o contentamento que sinto em ter sido tua aluna. Te levo para a vida toda, como exemplo de pessoa e profissional que ama o que faz. És inspiração.

Agradeço ao respeitável Prof. Dr. Adair (in memoriam), pela contribuição e incentivo para esse projeto. Infelizmente não pude conhece-lo pessoalmente, mas conheço seu trabalho, e tenho certeza que sua passagem por esse mundo foi brilhante.

Com muito carinho agradeço a todos os colegas do laboratório e ao grupo de orientandos da Prof. Fran, em especial a Elisa que esteve presente desde o início, acredito que juntas conseguimos desenvolver um trabalho melhor, além de ser meu ombro amigo, e agradeço também a Francielly que dividiu todos os anseios de ser mestrandia, vocês todos me ajudaram não só nos experimentos e desenvolvimento do projeto, mas também emocionalmente (foram muitas palavras de conforto), nossa troca de saberes foi fundamental para que tudo isso saísse do papel. Agradeço também ao Josiel, Verônica, Ana Caroline e Alexandre que com suas expertises e contribuições foram indispensáveis para o desenvolvimento dos experimentos.

Agradeço ao Laboratório de Neurociências Experimental da UNISUL (LaNEx), por toda estrutura e experiência que me proporcionou. Agradeço ainda aos animais do laboratório, indispensáveis para o meu trabalho, vocês têm todo o meu respeito. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e todos os professores que me ajudaram a construir conhecimento e ampliar meus horizontes.

Agradeço também o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Comunitárias de Ensino Superior (PROSUC/CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 421556/2018-8).

Enfim, minhas saudações e gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para esses dois anos de aprendizado. Muito Obrigada!

“É justo que muito custe o que muito vale” – Santa Tereza d’ Ávila

RESUMO

Introdução: O exercício físico é uma estratégia bem estabelecida para a redução da dor neuropática; no entanto, seu mecanismo ainda não está totalmente elucidado, especificamente as interações entre o sistema imunológico e opioide nas estruturas supraespinais.

Objetivo: Avaliar o bloqueio dos receptores opioides sobre a ação do exercício físico de baixa intensidade nos componentes sensorial, cognitivo e emocional da dor neuropática após a lesão do nervo isquiático e verificar as interações do receptor μ com citocinas Th2 e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).

Métodos: Estudo experimental pré-clínico, utilizou o modelo de esmagamento do nervo isquiático em camundongos, submetidos ao protocolo de exercício físico em esteira por 2 semanas, utilizando-se o pré-tratamento dos animais exercitados com naloxona (5 mg/kg, i.p.). Os componentes sensorial, cognitivo e emocional nos animais foram avaliados, respectivamente, pelo teste de von Frey, *Mechanical Conflict Avoidance-System* (MCAS) e teste de campo aberto. No 15º dia após a lesão amostras do tronco encefálico e córtex pré-frontal (CPF) foram utilizadas para o Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA), que mensurou as interleucinas (IL)-4, a IL-10 e o BDNF, e para o ensaio de Western blotting, que quantificou imunoconteúdo dos receptores μ .

Resultados: A redução da hiperalgesia mecânica e da latência de escape no MCAS foi prevenida pelo pré-tratamento com naloxona. No entanto, o exercício físico e a pré-administração da naloxona não alteraram a redução da exploração no centro do campo aberto. O exercício físico reduziu as concentrações de IL-4, IL-10 e BDNF no CPF e ainda, de BDNF no tronco encefálico, sendo que o pré-tratamento com naloxona preveniu a redução de BDNF e IL-4 no CPF.

Conclusão: O bloqueio dos receptores μ preveniu o efeito do exercício físico nos componentes sensorial e cognitivo, e promoveu efeito imunorregulatório das citocinas Th2 e BDNF no tronco encefálico e CPF.

Descritores: Exercício físico. Dor neuropática. Citocinas. Receptor opioide. Tronco encefálico. Córtex pré-frontal.

ABSTRACT

Introduction: Physical exercise is a well-established strategy for the reduction of neuropathic pain; however, its mechanism is not yet fully elucidated, specifically the interactions between the immune and opioidergic systems in the supraspinal structures.

Objective: To evaluate the blockade of opioid receptors on the action of low-intensity physical exercise on the sensory, cognitive and emotional components of neuropathic pain after sciatic nerve injury and to verify the interactions of the μ receptor with Th2 cytokines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Methods: Pre-clinical experimental study, using the sciatic nerve crush model in mice, submitted to a protocol of physical exercise on a treadmill for 2 weeks, using pre-treatment of the animals exercised with naloxone (5 mg/kg, i.p.). The sensory, cognitive and emotional components in the animals were evaluated, respectively, by the von Frey test, Mechanical Conflict Avoidance-System (MCAS) and open field test. On the 15th day after the injury, samples from the brainstem and prefrontal cortex (PFC) were used for the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), which measured interleukins (IL)-4, IL-10 and BDNF, and for the Western blotting assay, which quantified the immunoccontent of μ receptors.

Results: The reduction in mechanical hyperalgesia and escape latency in MCAS was prevented by pretreatment with naloxone. However, physical exercise and pre-administration of naloxone did not alter the reduction in exploration in the center of the open field. Physical exercise reduced the concentrations of IL-4, IL-10 and BDNF in the CPF and also of BDNF in the brainstem, and the pre-treatment with naloxone prevented the reduction of BDNF and IL-4 in the CPF.

Conclusion: Blockade of μ receptors prevented the effect of physical exercise on sensory and cognitive components, and promoted the immunoregulatory effect of Th2 and BDNF cytokines in the brainstem and PFC.

Keywords: Physical exercise. Neuropathic pain. Cytokines. Opioid receptor. Brainstem. Prefrontal cortex.

LISTAS

Lista de Abreviaturas

AMPA - Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (do inglês, *Alpha amino-3-hydroxy-methyl-5-4-isoxazolepropionic*)

ANOVA - Análise de Variância (do inglês, *Analysis of Variance*)

ATP– Trifosfato de Adenosina (do inglês *Adenosine Triphosphate*)

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (do inglês, *Brain-derived Neurotrophic Factor*)

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CatS – Catepsina S (do inglês, *Cathepsin S*)

CCL2 – Ligante de Quimiocina C-C motif 2 (do inglês, *C-C motif 2 chemokine ligand*)

CGRP - Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (do inglês, *Calcitonin Gene Related Peptide*)

CX3CR1 – Receptor 1 de Quimiocina C-X3-C (do inglês, *Chemokine Receptor 1 C-X3-C*)

CXCR5 - Receptor 5 de Quimiocina C-X5 (do inglês, *Chemokine Receptor 5 C-X5*)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONCEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DBCA – Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos

DP – Desvio Padrão (do inglês, *Standard Deviation*)

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ERK - Cinases Reguladas por Sinal Extracelular (do inglês, *Extracellular Signal-Regulated Kinases*)

GPCRs - Receptores Acoplados à Proteína G (do inglês, *G-protein coupled receptors*)

IL-10 – Interleucina-10 (do inglês, *Interleukin-10*)

IL-1ra - Antagonista do Receptor para Interleucina-1 (do inglês, *Receptor Antagonist for Interleukin-1*)

IL-1 β – Interleucina-1 β (do inglês, *Interleukin-1 β*)

IL-4 – Interleucina-4 (do inglês, *Interleukin-4*)

IL-5 – Interleucina-5 (do inglês, *Interleukin-5*)

IP - Intraperitoneal

LaNEx – Laboratório de Neurociências Experimental

LNP – Lesão Nevosa Periférica (do inglês, *Peripheral Nervous Injury*)

MAPK – Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (do inglês, *Mitogen-activated protein kinases*)

M1 – Macrófago M1 Fenótipo Pró-inflamatório (do inglês, *Macrophage M1 Pro-inflammatory Phenotype*)

M2 – Macrófago M2 Fenótipo Anti-inflamatório (do inglês, *Macrophage M2 Phenotype Anti-inflammatory*)

MCAS – Teste de Esquiva ao Estímulo Mecânico (do inglês, *Mechanical Conflict-Avoidance System*)

MIA – Morte Indolor Assistida

MMP-9 - Metaloproteases de Matriz 9 (do inglês, *Matrix 9 metalloproteases*)

MMP-2 –Metaloproteases de Matriz 2 (do inglês, *Matrix 2 metalloproteases*)

NAV – Canal de Sódio Dependente de Voltagem (do inglês, *Voltage Dependent Sodium Channel*)

NGF – Fator de Crescimento do Nervo (do inglês, *Nerve Growth Factor*)

NMDA - N-Metil-D-Aspartato (do inglês, *N-Metil-D-Aspartato*)

NT-3 – Neurotrofina-3 (do inglês, *Neurotrophin-3*)

NT-4 – Neurotrofina-4 (do inglês, *Neurotrophin-4*)

P2X4 – P2X Purinoceptor 4 (do inglês, *P2X Purinoceptor 4*)

P2X7 - P2X Purinoceptor 7 (do inglês, *P2X Purinoceptor 7*)

P2Y12 – Receptor Purinoceptor 12 (do inglês, *Purinoceptor 12 Receptor*)

PGE₂ – Prostaglandina E₂ (do inglês, *Prostaglandin E2*)

PKA – Proteína Cinase A (do inglês, *Protein Kinase A*)

PKC - Proteína Cinase C (do inglês, *Protein Kinase C*)

POMC – Proopiomelanocortina (do inglês, *Proopiomelanocortin*)

PROSUC – Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Comunitárias de Ensino Superior

STAT6 - Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 6 (do inglês, *Signal Transducer and Transcription Activator 6*)

SNC – Sistema Nervoso Central (do inglês, *Central Nervous System*)

SNP – Sistema Nervoso Periférico (do inglês, *Peripheral Nervous System*)

OPRK1- Gene Receptor Opióide Kappa 1 (do inglês, *Kappa 1 Opioid Receptor Gene*)

OPRD1 – Gene Receptor Opióide Delta 1 (do inglês, *Delta 1 Opioid Receptor Gene*)

OPRM1 – Gene Receptor Opióide mu 1 (do inglês, *Mu 1 Opioid Receptor Gene*)

TNF – Fator de Necrose Tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*)

TLR4 - Receptor *Toll-like* 4 (do inglês, *Toll-like Receptor 4*)

TRPV – Receptor de Potencial Transiente Vaniloide (do inglês, *Vanilloid Transient Potential Receiver*)

TRPA1 - Receptor Transiente Anquirina 1 (do inglês, *Ankyrin Transient Receptor 1*)

TRPV1 - Receptor de Vaniloide 1 (do inglês, *Vanilloid Receptor 1*)

TRPV4 - Receptor de Potencial Transiente Vaniloide 4 (do inglês, *Vanilloid 4 Transient Potential Receiver*)

TLRs – Receptores *Toll-like* (do inglês, *Toll-like Receptor*)

TLR2 - Receptor *Toll-like* 2 (do inglês, *Toll-like Receptor 2*)

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

vF – von Frey

WB – *Western blotting*

Lista de Quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo.....51

Lista de Figuras

Figura 1 - Localização da expressão dos genes MOR, DOR e KOR no encéfalo humano.....24

Figura 2 - IL-4 induzindo macrófagos M2 para produção de analgesia via opioides.....	34
Figura 3 – Desenho experimental.....	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Efeito analgésico do exercício físico em esteira em modelos animais.....	30
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1.1	Dor neuropática.....	18
1.1.2	Sistema opioide.....	22
1.1.3	Efeito analgésico do exercício físico e mecanismo opioide	25
1.1.4	Citocinas Th2, BDNF e suas interações com o exercício físico e o sistema opioide	32
2	OBJETIVOS	40
2.1	OBJETIVO GERAL.....	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3	METODOLOGIA	41
3.1	TIPO DE ESTUDO.....	41
3.2	MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	41
3.3	ANIMAIS E CÁLCULO AMOSTRAL.....	42
3.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	43
3.5	DELINIAMENTO DO ESTUDO	43
3.5.1	Indução da lesão por esmagamento do nervo isquiático	46
3.5.2	Protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade	46
3.5.3	Investigação do sistema opioide no efeito do exercício físico	47
3.5.4	Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	47
3.5.5	Teste de esQUIVA ao estímulo mecânico.....	48
3.5.6	Teste do campo aberto.....	48
3.5.7	EnsaioS bioquímicos	49
3.5.7.1	Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima.....	49
3.5.7.2	Western blotting	50
3.7	VARIÁVEIS DE ESTUDO	51
3.8	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS	51
3.9	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	52
4	ARTIGO	53
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A.....	70

1 INTRODUÇÃO

A dor neuropática surge como consequência da lesão ao sistema somatossensorial periférico e é tipicamente caracterizada por hiperalgesia, alodinia, bem como pela dor espontânea¹. Estudos epidemiológicos indicam que a dor neuropática é relativamente comum, com uma prevalência estimada na população mundial em torno de 6,9 % e 10 %², sendo que uma em cada três pessoas acometidas é incapaz de manter-se independente na execução das tarefas de vida diárias devido à sua condição³. Como consequência, a dor neuropática promove um decréscimo importante na qualidade de vida dos indivíduos e gastos excessivos do sistema público de saúde com o tratamento destas disfunções; Nos Estados Unidos, é estimado que o custo anual do tratamento da dor neuropática periférica pós-traumática ou pós-cirúrgica é de, aproximadamente, 5 mil dólares anuais por paciente, sendo que os custos indiretos ao tratamento podem alcançar até, aproximadamente, 27 mil dólares anuais⁴.

As interações neuroimunes são importantes mecanismos na sensibilização dos nociceptores, promovendo à sensibilização periférica e central após uma lesão ao sistema nervoso periférico (SNP). No processo de degeneração neuronal, vários tipos de leucócitos são recrutados para o local da lesão, incluindo macrófagos, linfócitos T, *natural killer* e neutrófilos. As alterações após a lesão nervosa periférica (LNP) promovem mudanças na atividade dos neurônios da medula espinal e do encéfalo, que são referidas como sensibilização central⁴. Além da ativação da micróglia residente, foi demonstrado que monócitos derivados da medula óssea que infiltram a medula espinal tem um papel importante no desenvolvimento da dor neuropática após a lesão de nervo periférico⁴.

Opioides endógenos também fazem parte dessas interações neuroimunes, sendo encontrados em linfócitos T, granulócitos e monócitos infiltrados em tecidos lesionados. Essas células imunes são importantes fontes desses peptídeos e podem contribuir para a atenuação da dor inflamatória e neuropática^{1,5}. O presente trabalho propõe a utilização do exercício físico como

terapia analgésica para a dor neuropática. Sabe-se que maiores níveis de atividade física estão associados a um menor risco de desenvolver dor crônica⁶ e que o exercício físico produz mudanças nos sistemas centrais opioidérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos^{7,10}. Além da ativação de sistemas de controle descendente da dor, já foi demonstrado que o exercício físico está associado à produção e aumento de citocinas, levando ao aumento das citocinas Th2, como interleucina-4 (IL-4) e de interleucina-10 (IL-10)^{9,11}. Embora ainda não sejam conhecidas as fontes exatas de IL-4 e IL-10 geradas durante o exercício, é bem caracterizado o papel parácrino das citocinas Th2 na promoção da diferenciação de monócitos circulatórios em macrófagos com fenótipo anti-inflamatório (M2)^{9,12}.

A relação das citocinas Th2 com o sistema opioide será tema de estudo nesse trabalho. O peptídeo opioide β -endorfina é um ligante endógeno do receptor μ e além de ser considerada um neuropeptídeo, tem sido apontada como uma citocina Th2¹³. Há muito tempo já foi demonstrado uma estreita relação entre a β -endorfina e a regulação de células T. Sabe-se que os efeitos imunológicos da β -endorfina podem ser exercidos através da ativação da IL-4, uma citocina Th2^{14,15}. Além disso, demonstrou-se que a morfina e a β -endorfina induzem uma mudança de um padrão de citocinas do tipo Th1 para Th2¹⁶. Por outro lado, o bloqueio da β -endorfina por anticorpos ou o bloqueio dos receptores opioides μ pela naloxona, antagonista não seletivo do receptor μ , resultou em uma mudança do padrão de citocinas do tipo Th2 para o Th1^{17,18}. Foi demonstrado que os receptores opioides μ , para os quais a β -endorfina e a morfina são ligantes, são induzidos pela IL-4 em células imunes, células dendríticas e células neuronais primárias. O sinal da IL-4 é diretamente transduzido para o promotor do gene do receptor opioide μ via transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 (STAT6)¹⁹. O aumento da informação sobre a IL-4 e seus receptores no cérebro sugere a importância dessa citocina no ambiente neuronal^{20,21}. Foi demonstrado que altos níveis de IL-4 estão presentes no cérebro de camundongos no período neonatal²². Pode ser interessante, nesse contexto, a informação de que altos níveis de STAT6 também foram encontrados no encéfalo em desenvolvimento, localizados em regiões que expressam abundantemente receptores opioides μ , como hipocampo, estriado e córtex,

sugerindo um possível papel da IL-4 na regulação do desenvolvimento da expressão do receptor μ^{23} .

A literatura atual é escassa quanto a evolução da compreensão das interações bidirecionais entre o sistema opioide e o sistema imunológico, o que é proposto nesse estudo. É questionável, se as alterações nas concentrações de IL-4 no sistema nervoso central (SNC) podem afetar potencialmente a efetividade dos tratamentos analgésicos (como exercícios físicos) modulando o número de receptores opioides μ . De uma maneira geral, a interação que ocorre entre diferentes sistemas pode atuar de forma coordenada para a redução da dor e melhora do processo de neuroinflamação, frente à uma lesão do SNP, contribuindo para a manutenção da homeostasia corporal. Nesse sentido, a pergunta dessa pesquisa é: Quais os efeitos do exercício físico de baixa intensidade sobre as interações neuroimunes entre o sistema opioide e citocinas Th2 e suas consequências na dor e neuroinflamação após a lesão do SNP?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Dor neuropática

A dor neuropática é definida como dor decorrente de lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial. É uma síndrome complexa, com mecanismos biológicos pouco esclarecidos, envolvendo teorias inflamatórias e imunológicas²⁴. A prevalência da dor neuropática é variada², devido às múltiplas etiologias e modos de manifestar-se, podendo localizar-se em qualquer nível do sistema nervoso, sendo classificada como periférica ou central²⁴. A prevalência mundial é estimada entre 6,9 % e 10 %, mas alguns estudos admitem que o componente neuropático possa estar presente em 35 % de todas as síndromes dolorosas². Essa grande heterogeneidade dos dados se deve as diferentes definições e aos métodos de avaliação utilizados, entretanto, as estimativas de prevalência baseadas em causas específicas de dor neuropática tendem a ser mais baixas (1-2 %) do que aquelas que são baseadas em relatórios dos sintomas clássicos (6-8 %)². No Brasil, a dor crônica é comum com prevalência

de 41 % da população e estima-se que destes, 10 % sejam portadores de dor neuropática².

Lesões traumáticas de nervos espinais, são exemplos de dor neuropática e foi o modelo de dor induzida utilizada nesse estudo. Em humanos, a incidência anual global de aproximadamente 500 mil casos, gerando um prejuízo funcional, diminuição da qualidade de vida, perda parcial ou total de funções motoras, sensoriais e autonômicas²⁵.

A dor é uma das razões mais comuns e mais pessoalmente convincentes para procurar atendimento médico²⁶. As pessoas procuram os serviços de saúde para a dor não apenas para avaliação diagnóstica e alívio dos sintomas, mas também porque a dor interfere nas atividades diárias, causa preocupação, desgaste emocional e prejudica a confiança na saúde²⁶. Quando a dor persiste por semanas ou meses, seus efeitos mais amplos sobre o bem-estar podem ser profundos. A saúde psicológica e o desempenho das responsabilidades sociais, laborais e na vida familiar podem ser significativamente prejudicados²⁶.

A dor crônica é caracterizada por sintomas espontâneos (por exemplo, queimação) e sintomas evocados em resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia) e/ou não nocivos (alodinia). Na dor neuropática a plasticidade neuronal e sináptica, juntamente com as interações neuroimunes nas vias e circuitos da dor resultam em dor crônica. A plasticidade neuronal ocorre nos trajetos dos neurônios sensoriais de primeira ordem e nos gânglios sensoriais dos nervos espinais e/ou gânglios trigeminais (sensibilização periférica), bem como em neurônios de processamento de dor na medula espinal e no encéfalo (sensibilização central)^{27,28}.

A dor neuropática após lesão tecidual é gerada por neurônios que sinalizam por meio da ativação ou sensibilização de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), receptores ionotrópicos e receptores de tirosina cinase localizados nos terminais neuronais e corpos celulares. Esses receptores são diretamente ligados e ativados por uma variedade de mediadores, incluindo bradicinina, prostaglandinas (por exemplo, PGE₂), íon H⁺, trifosfato de adenosina (ATP), fator de crescimento do nervo (NGF), citocinas e quimiocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina IL-1β (IL-1β) e o ligante de quimiocina C-C motif 2 (CCL2)²⁹⁻³¹. O fenômeno da sensibilização periférica, que

é marcado por um estado de hiperexcitabilidade de nociceptores como resultado da lesão e inflamação tecidual, é causado pela ativação de canais iônicos, incluindo os canais iônicos do receptor de potencial transiente vaniloide (TRPV), receptor potencial receptor transiente anquirina 1 (TRPA1), receptor de vaniloide 1 (TRPV1), receptor de potencial transiente vaniloide 4 (TRPV4)^{32,33}, canais de sódio voltagem dependentes (Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9)^{34,35} e canais iônicos mecano-sensíveis³⁶. As vias intracelulares que levam a indução e manutenção de sensibilização envolvem a ativação de proteínas cinases incluindo, proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), proteína cinase A (PKA) e proteína cinase C (PKC)³⁷⁻⁴⁰. A expressão continuamente aumentada de TRPV1 mantém o estado de sensibilização periférica e, conseqüentemente, a transição de aguda para dor crônica⁴¹⁻⁴³.

Nociceptores e células imunológicas estão envolvidos na comunicação neuroimune, envolvendo um repertório comum de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e receptores *toll-like* (TLRs)^{44,45}. Assim, no contexto da neuroinflamação e dor, as interações neuroimunes permitem a modulação da resposta dos nociceptores e células imunológicas frente à lesão. Dessa maneira, as células imunes residentes iniciam o processo, recrutando populações de células imunes hematológicas para a área de inflamação. Um exemplo particular é o papel da sinalização neuronal de TLR na regulação da ativação de macrófagos em torno dos gânglios sensoriais dos nervos espinais, produzindo CCL2 nos nociceptores⁴⁴⁻⁴⁶. Amaya e colaboradores³⁸ demonstraram que a indução da proteína do grupo box 1 de alta mobilidade (HMGB-1), um ligante endógeno de receptores TLR2/4, aumenta no gânglio sensorial do nervo espinal após lesão neuronal periférica, e este processo é crítico para a indução de dor neuropática³⁸.

A inflamação periférica também resulta em hiperatividade do SNC. O SNC exhibe aumentos na produção e liberação de neurotransmissores e/ou neuromoduladores envolvidos na inflamação, incluindo glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). O glutamato, liberado excessivamente na medula espinal, bem como a interação neurônio-glia através de citocinas e outros moduladores, promovem a ativação de células gliais (microglia e astrócito). Uma

vez que estas células se tornam reativas, ativam cascatas de sinalização intracelular que são fatores chaves para o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (ex. TNF, IL-1 β), contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática⁴¹.

Além disso, há envolvimento de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) para glutamato e inserção de receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) na membrana neuronal pré-sináptica, bem como ativação de cinases reguladas por sinal extracelular (ERK) em neurônios pós-sinápticos⁴⁷ que iniciam e mantem a sensibilização central^{28,41}.

A neuroinflamação que ocorre após LNP se localiza tanto no SNP quanto no SNC³⁰. A neuroinflamação inclui aumento da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, ativação de células gliais e aumento na produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas. No estado de neuroinflamação, a barreira hematoencefálica está sujeita a um aumento da permeabilidade, expondo o SNC a infiltração aumentada de células imunológicas periféricas³⁰. Sabe-se que, a dor crônica geralmente é uma condição que continua além da resolução dos sinais clínicos iniciais, nesse caso, a neuroinflamação pode ser responsável pela mediação e continuação da dor⁴⁸. O envolvimento de diferentes mediadores neuroinflamatórios e interações neuroimunes na modulação da sensibilidade à dor é uma área de investigação particularmente interessante. A glia periférica (células de Schwann e células gliais satélites) e a glia central (microglia, astrócitos e oligodendrócitos) são ativados durante a neuroinflamação^{49,50}. Nos gânglios sensoriais dos nervos espinais, a lesão do nervo não só causa alterações neuronais levando à sensibilização periférica, mas também resulta em ativação de células gliais satélites, o que contribui para a neuroinflamação periférica e dor neuropática via interações entre neurônios e células gliais⁵⁰. A ativação de micróglia e astrócitos é o foco da maioria dos estudos que observa o papel da glia sobre a dor, e os mediadores e ações produzidas por essas células desempenham papéis modulatórios importantes nos processos de plasticidade sináptica e sensibilização central^{50,51}. A lesão do nervo resulta em ativação dessas células na medula espinal^{52,53}. Vários receptores, como receptores de ATP, purinoceptor 2 (P2X), purinoceptor 4 (P2X4), purinoceptor 7 (P2X7) e purinoceptor 12

(P2Y₁₂)^{52,54,55}; receptor 1 de quimiocina (CX3CR1), receptor 5 de quimiocina (CXCR5)^{54,56}, receptor *toll like* 4 (TLR4)⁵⁵, juntamente com proteases, tais como metaloproteases de matriz 9 (MMP-9), metaloproteases de matriz 2 (MMP-2) e catepsina S (CatS)^{55,57}, são responsáveis por regular a ativação glial e a dor neuropática. Em resumo, a neuroinflamação central mantém os estados de dor crônica, incluindo dor crônica neuropática.

1.1.2 Sistema opioide

A percepção da dor é modulada por múltiplos sistemas de controle endógenos envolvendo peptídeos opioides e outros neuromoduladores como serotonina, dopamina, noradrenalina, endocanabinoides, entre outros³¹. Especificamente, existem quatro principais famílias de ligantes opioides endógenos: β -endorfinas, encefalinas, dinorfinas e nociceptina/orfanina FQ (N/O FQ)⁵⁸. Ainda, o sistema opioide endógeno compreende três receptores acoplados a proteína G inibitória: receptor- μ , receptor- δ e receptor- κ , codificados respectivamente pelos genes, gene receptor opioide mu 1 (OPRM1), gene receptor opioide delta 1 (OPRD1) e gene receptor opioide kappa 1 (OPRK1). Um quarto receptor é relacionado ao sistema opioide, o receptor N/O FQ, codificado pelo gene NOP. No entanto, embora esse receptor exiba alto grau de homologia estrutural com os receptores opioides convencionais, ele exibe uma farmacologia distinta^{59,60}. A N/O FQ é um peptídeo composto por 17 aminoácidos e que difere dos outros agonistas dos receptores opioides, porque não possui um resíduo de tirosina na porção N terminal, que é requerido para a atividade agonística dos receptores opioides μ , δ e κ ⁶¹. É importante ressaltar que cada receptor possui um padrão de expressão distinto em todo o córtex cerebral e medula espinal. Esses peptídeos opioides, juntamente com seus receptores cognatos são amplamente expressos no encéfalo e medula espinal, em particular, na via da dor⁵⁸.

Estudos demonstram o papel central do receptor- μ opioide na regulação da dor⁵⁸⁻⁶¹. A importância dos receptores opioides do sistema nervoso na regulação endógena da dor em humanos foi destacada por estudos de tomografia por emissão de pósitrons, que demonstram a ativação desses

receptores em várias regiões do encéfalo, durante a estimulação dolorosa⁵⁸⁻⁶¹. Essas áreas ativadas incluem a substância cinzenta periaquedutal, o tálamo medial e lateral, o hipotálamo, o núcleo accumbens e amígdala, bem como nos córtices insular, cingulado anterior e pré-frontal⁵⁸⁻⁶².

Os peptídeos opioides neuronais são sintetizados no corpo dos neurônios, envoltos em vesículas de núcleo denso e transportados até os terminais do axônio. O ligante canônico do receptor μ é a β -endorfina, esta é clivada da molécula proopiomelanocortina (POMC), que é expressa no núcleo arqueado e no núcleo do trato solitário⁵⁸⁻⁶². Além dos receptores μ , a β -endorfina atua em receptores para melanocortina e receptores para corticotropina. A β -endorfina pode ser clivada ainda em met-enkefalina, um agonista não seletivo com afinidade para receptores δ e μ ⁵⁸. Similar à β -endorfina, encefalinas e dinorfinas surgem de moléculas maiores que são clivados em transmissores peptídicos mais específicos⁵⁸.

Os neurônios dos gânglios sensoriais dos nervos espinais e gânglio trigeminal inervam órgãos periféricos e retransmitem informações somatossensoriais para a medula espinal e tronco encefálico, respectivamente, incluindo informações nociceptivas⁶³. Todos os quatro receptores opioides são expressos nos gânglios sensoriais dos nervos espinais^{64,65} e sua ativação por agonistas intradérmicos ou intratecais produzem antinocicepção^{66,67}. A ativação desses receptores diminui a liberação de glutamato e a liberação de neuropeptídeos (β -endorfinas, encefalinas, dinorfinas) dos neurônios aferentes no SNC⁵⁸.

Assim, após a ativação dos receptores opioides por agonistas, endógenos ou exógenos, as subunidades α e $\beta\gamma$ da proteína G se dissociam e subsequentemente ancoram uma variedade de efetores e cascatas de sinalização intracelular que normalmente deprimem as funções neurais. Os genes OPRK1, OPRD1, OPRM1, sinalizam através de um mecanismo independente de agonista chamado de atividade constitutiva, durante a dor e o estresse persistente⁶⁸⁻⁷⁰. A figura 1 mostra esquematicamente a localização diferencial de receptores mu (MOR), delta (DOR) e kappa (KOR) com base em padrões de expressão gênica no cérebro humano.

A ação dos peptídeos opioides, pode resultar de uma variedade de mecanismos, incluindo alterações na densidade dos receptores, alterações na fosforilação dos receptores, modulação dos locais de ligação alostérica ou alterações nas interações com proteínas acessórias tais como β -arrestina^{68,70}. Uma das vias mais conservadas que os receptores opioides usam para alterar a função dos neurônios é a modulação de canais iônicos. Todos os quatro receptores opioides inibem canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N, P/Q e L⁷¹. Nos neurônios dos gânglios sensoriais dos nervos espinais, os canais de cálcio do tipo N juntamente com receptores opioides podem ser co-internalizados após exposição prolongada ao agonista, o que pode reduzir ainda mais a liberação de neurotransmissores e a transmissão de sinais de dor para o SNC⁷². Esse processo gera ainda, uma ativação nos canais de potássio⁷², gerando na membrana pós-sináptica uma hiperpolarização⁵⁸.

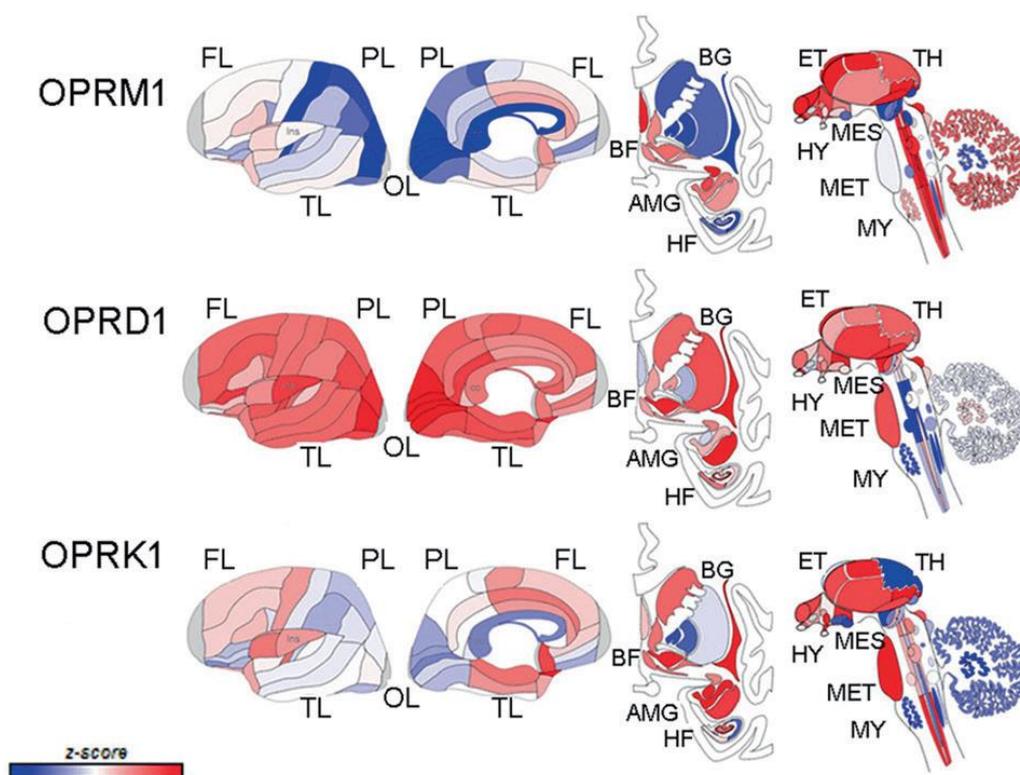


Figura 1. Localização da expressão dos genes MOR, DOR e KOR no encéfalo humano.

Diagrama esquemático da localização diferencial de MOR, DOR e KOR com base nos padrões de expressão gênica no encéfalo humano (doador H0351,1016, 55 anos, sexo masculino, branco ou caucasiano, fotos do *Allen Brain Atlas* <http://www.brain-map.org>). As primeiras duas colunas mostram as superfícies externa e interna do hemisfério esquerdo. As estruturas subcorticais são

representadas na vista frontal (terceira coluna) e as estruturas subcorticais e do tronco encefálico são mostradas na vista lateral (quarta coluna). A barra de cores exibe os valores de expressão usando a normalização de pontuação. FL, lobo frontal; PL, lobo parietal; TL, lobo temporal; OL, lobo occipital; BG, gânglios da base; BF, base frontal; AMG, amígdala; MES, mesencéfalo; HF, hipófise; HY, hipotálamo; MET, metencéfalo; MY, mielencéfalo; ET, epitálamo; TH, tálamo.

Fonte: Adaptado de Valentino et al⁷³. (2018)

Embora a ação aguda dos opioides, de segundos a minutos, nos canais de cálcio e potássio normalmente reduzem a neurotransmissão, de forma crônica (horas a dias) ou interrompida abruptamente, a sinalização opioide pode facilitar a plasticidade sináptica excitatória^{65,73}. Por exemplo, a retirada abrupta de opioides exógenos pode provocar potenciação de longa duração da transmissão sináptica entre nociceptores aferentes primários do gânglio sensorial do nervo espinal e neurônios de segunda ordem da medula espinal. Esta forma de potencial de longa duração espinal é considerada um substrato importante para a hiperalgesia induzida por opioide^{65,74}.

1.1.3 Efeito analgésico do exercício físico e mecanismo opioide

A inatividade física foi identificada como o principal fator de risco para a mortalidade no mundo, contribuindo para o aumento do sobrepeso e obesidade e ainda, para o aparecimento de diversas doenças crônicas não transmissíveis, como a síndrome metabólica, o câncer, doenças cardiovasculares e neuropsiquiátricas⁷⁵. Atrelado a isso, a inatividade física é um fator de risco para o desenvolvimento da dor crônica⁷⁶, como por exemplo, dor musculoesquelética^{77,78}.

Diferentes programas de atividade física e exercícios, são cada vez mais promovidos e oferecidos nos sistemas de saúde, a fim de prevenir a inatividade física e as comorbidades associadas. Portanto, é importante neste estágio estabelecer a eficácia e segurança desses programas e, além disso, abordar os fatores críticos que determinam seu sucesso ou fracasso⁷⁹.

Para pessoas com dor, a perspectiva de fazer exercícios pode parecer uma tarefa opressora e impossível, e por muitos anos, a escolha do tratamento para essa condição incluiu recomendações de repouso e inatividade física.

Embora uma sessão aguda de exercício possa aumentar a dor e gerar desconforto em indivíduos com dor crônica, a atividade física regular e o exercício físico podem prevenir e aliviar a essa condição e melhorar a função física e o humor⁷⁹.

O uso de exercícios⁸⁰⁻⁸², na prática fisioterapêutica há muito tempo foi reconhecido por sua eficácia na redução de deficiências e custos em saúde. Um substancial e crescente corpo de evidências mostra que o treinamento de exercícios em longo prazo pode fornecer alívio da dor em diferentes condições, incluindo fibromialgia dor generalizada, osteoartrite, dor lombar crônica, dor cervical crônica e dor neuropática⁸³.

A hipoalgesia induzida por exercício ocorre quando um estímulo nocivo é percebido como menos doloroso após uma sessão de exercícios aeróbicos, resistidos ou isométricos⁸⁴. Algumas pesquisas sugerem que a hipoalgesia aguda é de curta duração (60 min), embora estudos em indivíduos saudáveis demonstraram aumento da tolerância à dor evocada após 6 semanas de treinamento aeróbio em relação a avaliação pré-intervenção⁷⁸. Um estudo realizado em camundongos com dor crônica demonstrou que duas semanas de treinamento aeróbio em roda de corrida, por 2 h, foi capaz de reduzir significativamente a resposta à dor evocada⁸⁵.

O exercício físico é capaz de induzir alterações em diversos sistemas biológicos^{85,86}. As contrações musculares estimulam as fibras nociceptivas A δ e C, e esta estimulação demonstrou resultar na ativação dos mecanismos de analgesia endógena, incluindo alterações nos sistemas modulatórios descendentes da dor⁸⁷. Um dos mecanismos centrais amplamente estudados sobre analgesia induzida por exercício físico é a ativação do sistema opioide endógeno⁸⁸⁻⁹¹. Alguns estudos sugerem que o aumento da atividade opioide endógena pode contribuir especificamente para a hipoalgesia após o exercício aeróbio^{92,93}.

Os mecanismos opioidérgicos centrais podem modular os efeitos positivos do exercício físico, como melhora do humor, analgesia e redução do estresse⁷⁶. No entanto, não se sabe como a intensidade do exercício e as alterações concomitantes afetam as respostas opioidérgicas centrais e ainda, os mecanismos que promovem a ação analgésica opioide após exercícios

aeróbicos não são totalmente compreendidos⁷⁶. Além das mudanças gerais na resposta à dor, o exercício físico por meio de mecanismos opioides geram efeitos analgésicos prolongados⁷⁸.

Bruehl et al. (2020) em seu ensaio clínico randomizado avaliou a eficácia analgésica de exercícios aeróbios, comparado a um grupo controle, sendo esses participantes pouco ativos. O protocolo de exercício aeróbio incluiu caminhada, corrida em esteira, exercício de *step*, elíptico ou ciclismo, conforme preferido pelo participante, para minimizar a exacerbação dos sintomas de dor lombar e maximizar a aderência ao programa de treinamento⁷⁷. A intensidade do exercício foi de 70 % a 80 % da capacidade do indivíduo. Os resultados indicaram que a intervenção com exercício físico levou a analgesia durante 8 semanas⁷⁷. Os participantes do grupo que realizaram exercício também relataram melhorias globais, como aumento da tolerância a dor, melhora nas realizações de atividades de vida diária e diminuição na dor referida, em comparação aos indivíduos do grupo controle⁷⁷. Embora ambos os sexos pareçam se beneficiar igualmente do efeito analgésico e funcional do exercício físico, os homens relataram maiores benefícios globais comparado às mulheres. Esse estudo destaca a ativação do sistema opioide endógeno relacionado ao exercício⁷⁷. Pacientes que receberam naloxona (intravenosa, 8 mg na primeira administração e 4 mg nas outras três aplicações) antes da sessão de exercício tiveram o bloqueio do efeito analgésico. Além disso, as mulheres que estavam no grupo exercitado apresentaram melhora em relação as mulheres do grupo controle, quando aplicado o Questionário da Dor de McGill⁷⁷.

Modelos animais foram desenvolvidos para mostrar o fenômeno analgésico e os mecanismos do sistema opioide endógeno⁹². Stagg e colaboradores, realizaram um estudo com protocolo de treinamento de exercício aeróbico em esteira, 5 dias por semana, durante 5 semanas a uma velocidade de 14-16 m/min, aumentando gradualmente para 30min/dia ao longo de 14 dias. Como resultado mostraram o efeito analgésico e aumento nos níveis encefálicos de opioides endógenos, principalmente na substância cinzenta periaquedutal e no bulbo ventromedial⁹². Mais recentemente, esses efeitos comportamentais foram replicados para exercícios de corrida em esteira, roda voluntária e treinamento de resistência, bem como em modelos de dor muscular não

inflamatória, dor neuropática, dor artrítica e dor induzida por glutamato^{94,95}. Especificamente, oito semanas de atividade em roda de corrida voluntária bloqueou a hiperalgesia em um modelo de dor muscular não inflamatória⁹⁴.

Estudos também mostraram aumento dos níveis dos peptídeos opioides endógenos: beta-endorfina e met-enkefalina, na substância cinzenta periaquedutal e bulbo rostral medial, após cinco semanas de corrida em esteira. Ainda, esses mesmos peptídeos estavam aumentados no hipotálamo após 8 semanas de treinamento na esteira, enquanto os níveis de beta-endorfina no líquido cefalorraquidiano estavam elevados por até 48 h, após uma única sessão de exercício^{11,96,97}. Peptídeos opioides met-enkefalina, leu-enkefalina e beta-endorfina aumentaram no córtex frontal de ratos fêmeas que tiveram acesso a roda voluntária de corrida por 4 semanas após a lesão do nervo isquiático⁹⁸. Da mesma forma, foi encontrado aumento do conteúdo de enkefalina nos gânglios sensoriais dos nervos espinais lombares, após 6 semanas de treinamento em esteira⁹⁹.

Ainda, foi demonstrado que cinco dias de atividade de corrida em roda voluntária impediu o desenvolvimento de hiperalgesia em um modelo de dor muscular induzida por exercício físico em camundongos selvagens, mas não em camundongos *knockout* para o receptor opioide μ , demonstrando a participação desses receptores no efeito analgésico do exercício físico¹⁰⁰. Tanto a atividade de corrida forçada, quanto a voluntária, por 7 dias aumentaram a expressão do receptor μ opioide no hipocampo. Curiosamente quando os animais foram submetidos à atividade de corrida voluntária ou forçada por 45 sessões ao longo de um período de 9 semanas, não ocorreu aumento da expressão desses receptores¹⁰⁰. Isso sugere que a ativação repetida do sistema opioide pelo exercício pode produzir uma regulação negativa compensatória da expressão do receptor opioide, semelhante ao observado na administração crônica de opioides exógenos como a morfina¹⁰⁰. Isso sugere que a ativação repetida do sistema opioide pelo exercício pode produzir uma regulação negativa compensatória da expressão do receptor opioide, semelhante ao observado na administração crônica de opioides exógenos como a morfina¹⁰⁰. A naloxona, um antagonista opioide que se liga aos receptores μ , δ e κ (com afinidades diferentes), administrada sistemicamente ou diretamente na substância cinzenta

periaquedutal ou no bulbo rostral ventromedial, duas importantes áreas para o sistema opioide endógeno, bloqueou os efeitos analgésicos produzidos pelo exercício físico. Por outro lado, a injeção sistêmica de naloxona metiodida, um antagonista opioide que não atravessa a barreira hematoencefálica, não bloqueou o efeito analgésico do exercício, sugerindo que o exercício físico, ativa o sistema opioide endógeno central, mas não periférico¹⁰⁰. Da mesma forma, os efeitos analgésicos da corrida em esteira em modelo animal de dor neuropática foram revertidos com a injeção subcutânea ou intracerebroventricular de naloxona, mas não de naloxona metiodida¹⁰⁰.

Além disso, o treinamento em esteira após a indução de osteoartrite do joelho causou diminuição na sensibilidade tátil, melhora na simetria de suporte de peso e redução da dor contínua. Esses efeitos analgésicos do exercício foram revertidos com naloxona sistêmica⁹⁴.

Embora o exercício seja uma das principais abordagens de tratamento para condições de dor crônica, ainda há muitas perguntas sobre exercício físico que precisam ser resolvidas. Especificamente, existem dúvidas sobre a prescrição adequada de exercícios, tipo, duração, intensidade e volume para populações de dor crônica. Da mesma forma, não se entende totalmente os mecanismos de alívio da dor induzida por exercício. Há um esforço para compreender os mecanismos subjacentes da analgesia induzida pelo exercício através do uso de modelos animais, que permitem uma melhor compreensão dos efeitos do exercício no encéfalo, medula espinal, sistema imunológico e SNP⁸⁶.

A tabela 1 sumariza a metodologia e os resultados de estudos em modelos animais de dor neuropática demonstrando o efeito analgésico do exercício físico em esteira.

Tabela 1. Efeito analgésico do exercício físico em esteira em modelos animais

(continua)

Referência	Modelo de Dor	Animais	Tipo de Exercício	Exercício de pré-treinamento	Início do exercício	Duração do Exercício e Intensidade	Eficaz para a Dor?
Arbat-Plana et al. ¹⁰¹	Neuropática - ressecção e reparo do nervo isquiático	Ratos fêmeas	Esteira	Não aplicado	3 dias após a lesão	18 m/min por 60 min, 5 dias na semana por 2 semanas	Sim, para mecânica da dor
Bobinski et al. ⁸	Neuropática - esmagamento do isquiático	Camundongos machos	Esteira	10 m/min por 10 min por 6 dias	3 dia pós-lesão	10 m/min por 30 min, 5 dias na semana por 2 semanas (apenas 2 semanas pós lesão)	Sim para sensibilidade mecânica
Bobinski et al. ⁷	Neuropática - esmagamento do isquiático	Camundongos machos	Esteira	10 m/min por 10 min por 6 dias	3 dia pós-lesão	10 m/min por 30 min, 5 dias na semana por 2 semanas (apenas 2 semanas pré-lesão, apenas 2 semanas pós-lesão ou pré e pós lesão por 4 semanas)	Sim, para sensibilidade mecânica e térmica
Bobinski et al. ¹¹	Neuropática – lesão do nervo isquiático	Camundongos machos	Esteira	10 m/min por 10 min por 6 dias	3 dia pós-lesão	5 dias na semana por 2 semanas, 30 min a 10 m/min (apenas 2 semanas após a lesão)	Sim, para sensibilidade mecânica
Chhaya et al. ¹⁰²	Neuropática – lesão na medula espinal	Ratos fêmeas	Esteira	Não-aplicado	5 dias pós-lesão	Iniciando em 5 m/min e aumentando a velocidade até 14 m/min por 20 min, 5 dias na semana por 4 semanas	Sim para sensibilidade mecânica

(conclusão)

Referência	Modelo de Dor	Animais	Tipo de Exercício	Exercício de pré-treinamento	Início do exercício	Duração do Exercício e Intensidade	Eficaz para a Dor?
Cobianchi et al. ¹⁰³	Neuropática - lesão por constrição crônica	Camundongos machos	Esteira	21 m/min até a exaustão ou 60 min, 5 d na semana por 2 semanas	3 dia pós-lesão	21 m/min até a exaustão ou 60 min, 5d ou 5 d na semana por 7 semanas	Sim para sensibilidade mecânica após 5 d de treinamento, não para > 0,5 d de treinamento
Wakaizumi et al. ¹⁰⁴	Neuropática – ligadura do nervo isquiático	Camundongos machos	Esteira	9 ou 6 ou 12 m/min por 60 min 5 dias na semana por 2 semanas	1 dia pós-lesão	6 ou 12 m/min por 60 min 5 dias na semana por 1 ou 2 semanas	Sim para sensibilidade mecânica e térmica (6 m/min e 12 m/min)
Yamaoka et al. ¹⁰⁵	Neuropática - ligadura do nervo isquiático	Ratos fêmeas	Esteira	Não-aplicado	1 dia pós-lesão	20 m/min em 10° inclinado por 10 min, 5 dias na semana por 6 semanas	Sim para sensibilidade mecânica e térmica
Stagg et al. ⁹²	Neuropática – lesão na medula espinal	Ratos machos	Esteira	18 m/min por 10 min, 2 dias na semana por 2 semanas	7º ou 21º dia pós-lesão	14–16 m/min por 30 min, 3 ou 5 dias na semana por 5 semanas; 10 ou 16 m/min por 30 min, 5 dias na semana por 5 semanas	Sim para sensibilidade mecânica e térmica; PID 7 5 21; 3 dias na semana, 5 dias na semana; 16 m/min: sim; 10 m/min: não

1.1.4 Citocinas Th2, BDNF e suas interações com o exercício físico e o sistema opioide

Citocinas e quimiocinas são moléculas de sinalização potentes, tão importantes para a vida quanto os hormônios e neurotransmissores. São proteínas de baixo peso molecular que medeiam a comunicação intercelular e são produzidas por muitos tipos de células, principalmente as do sistema imunológico. Essas moléculas orquestram uma variedade de processos que vão desde a regulação da inflamação local e sistêmica até a proliferação celular, metabolismo, quimiotaxia e reparo de tecidos¹⁰⁶. O equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é um conceito-chave para a interpretação da função imunológica⁷. Os dados experimentais disponíveis hoje indicam fortemente que vários tipos de estressores fisiológicos, incluindo exercício físico, podem influenciar a função imunológica e a produção de citocinas¹⁰⁷. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos centrais, incluindo a interação de opioides endógenos com o sistema imunológico é de grande interesse para a neurociência da dor.

A IL-4 foi citada pela primeira vez em 1982, pelos pesquisadores Howard e Paul¹⁰⁸, como uma citocina anti-inflamatória que atua como reguladora pleiotrópica de vários processos imunológicos e inflamatórios. Essa interleucina é normalmente secretada por linfócitos T *helper* 2 (Th2), mastócitos, eosinófilos, basófilos e macrófagos M2 e desempenha um papel protetor em distúrbios neurológicos¹⁰⁹. As ações benéficas da IL-4 são consideradas resultantes da inibição da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, proteases e espécies reativas de oxigênio¹¹⁰. É importante ressaltar que a dor patológica, como a dor resultante de lesão nervosa, está associada à neuroinflamação, pois as células imunes se acumulam nos nervos danificados. Notavelmente, as células imunes, como linfócitos, neutrófilos e macrófagos, contêm peptídeos opioides como a met-enkefalina, β -endorfina e dinorfina, que após a sua liberação reduzem a dor em modelos animais e em humanos^{111,112}.

Celik et al.¹⁰⁹, utilizaram como modelo de dor neuropática a lesão crônica por constrição do nervo isquiático em camundongos machos C57BL/6J, esses

desenvolveram hipersensibilidade mecânica profunda, com duração de 26 dias, além de hipersensibilidade ao calor¹⁰⁹. Os autores injetaram a IL-4 no nervo danificado, diariamente do 14º dia ao 21º dia. Este tratamento não modificou a hipersensibilidade ao calor, mas atenuou a hipersensibilidade mecânica¹¹⁸. Assim, a IL-4 produziu analgesia de 5 a 15 min após as primeiras 5 injeções até o 18º dia após a lesão do nervo isquiático, e persistiu por 24 horas após as outras 3 injeções, até o 22º dia¹⁰⁹. Ainda, a analgesia foi mantida após cessar as aplicações de IL-4, durante os quatro dias seguintes, perdurando até o 26º dia. Para determinar se os receptores de IL-4 contribuem para a longa duração da analgesia induzida por essa interleucina, foi utilizado um anticorpo bloqueador do receptor IL-4R α , que reduziu a analgesia induzida pela IL-4¹⁰⁹. Por outro lado, o anti IL-4R α não apresentou efeito quando injetado posteriormente, nos dias 22 e 26 após a lesão, quando a analgesia induzida por IL-4 permaneceu apesar de não haver mais aplicações de IL-4. Isso sugere que o receptor IL-4R α é necessário para a ação direta de IL-4, mas não está envolvido na ausência de IL-4 exógena, e implica que a analgesia induzida por IL-4 persistente envolve mecanismos adicionais¹⁰⁹.

Também foi demonstrado que peptídeos opioides são secretados por macrófagos M2 induzidos pela IL-4 *in vitro*. No 22º dia após a lesão do nervo, 24 h após a última injeção de IL-4, esses macrófagos expressaram altos níveis de RNAm e de peptídeos opioides¹⁰⁹. Em contraste, tanto o RNAm quanto os peptídeos opioides estavam substancialmente elevados, 4 dias após o fim das aplicações de IL-4, ou seja, no 26º dia. Foi observado também que o tratamento com IL-4 diminui a porcentagem de macrófagos de fenótipo pró-inflamatório (M1) e aumenta a porcentagem de macrófagos M2, sugerindo que as células que produzem peptídeos opioides em resposta ao tratamento com a IL-4 são os macrófagos M2¹⁰⁹. Foi observado também se a analgesia encontrada nos camundongos envolvia peptídeos opioides endógenos e os receptores opioides δ , μ e K. Para determinar se os receptores de IL-4 (IL-4R) contribuem para a analgesia de longa duração induzida por IL-4, os autores usaram o anticorpo bloqueador de IL-4R α e descobriram que a analgesia induzida por IL-4 foi diminuída pelo anti-IL-4R α , injetado no 21º dia após lesão do nervo isquiático¹⁰⁹.

Na Figura 2 podemos ver como a IL-4 induz macrófagos M2 a produzir analgesia sustentada por meio de opioides¹⁰⁹.

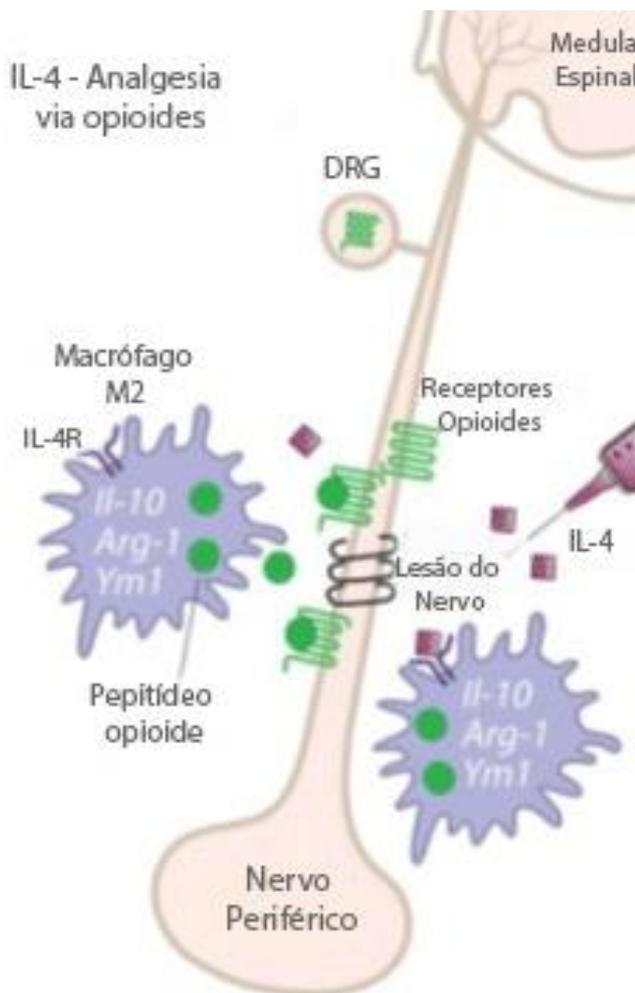


Figura 2. IL-4 induzindo macrófagos M2 para produção de analgesia via opioides. A IL-4 induz macrófagos M2 a produzir analgesia sustentada por meio de opioides. DRG, gânglio sensorial dos nervos espinais; IL-4, interleucina-4; IL-1 β , interleucina-1 β ; IL-10, interleucina-10; TNF, Fator de Necrose Tumoral; iNOS, óxido nítrico sintase induzida; Arg-1, arginase-1; Ym1, Chi3l3 – semelhante a quitinase 3.

Fonte: Adaptado Celik et al¹⁰⁹. (2020).

A resposta imunológica induzida pelo treinamento de exercício é um processo complexo que depende de vários fatores, como sua duração e intensidade. Estudos em modelos animais (camundongos e ratos), com protocolo de lesão no nervo isquiático e intervenção de exercícios em esteira, têm mostrado as interações neuroimunes e seu efeito na dor neuropática^{8,11}. Um trabalho do nosso grupo de pesquisa demonstrou que o exercício físico de baixa intensidade em esteira, realizado durante 30 minutos/dia (10m/min, sem

inclinação), 5 dias na semana, em camundongos *Swiss* machos com dor neuropática periférica induzida pelo esmagamento do nervo isquiático, reduziu os comportamentos de dor evocada e dor espontânea⁷. A lesão do nervo isquiático reduziu as citocinas anti-inflamatórias Th2, IL-4, interleucina 5 (IL-5) e antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1ra) no local da lesão, enquanto o exercício restaurou as concentrações de IL-4, IL-5 e IL-1ra para níveis pré-lesão. Ainda, camundongos *knockouts* para IL-4 e camundongos tratados com anticorpo anti-IL-4 tiveram o efeito analgésico do exercício em esteira inibido⁷. Nesse mesmo estudo foi possível perceber que o exercício em esteira aumentou a imunomarcção de macrófagos M2 e diminuiu macrófagos M1, quando comparados a camundongos sedentários, o que não ocorreu em camundongos *knockouts* para IL-4 exercitados⁷.

Após LNP, as interações neuroimunes na medula espinal também desempenham um papel fundamental na geração de dor. Nosso grupo de pesquisa também mostrou que a lesão por esmagamento do nervo isquiático aumentou a ativação das células gliais, os níveis BDNF e β -NGF e diminuiu os níveis de IL-4 e IL-1ra na medula espinal, além de aumentar os níveis de IL-1 β e TNF⁷, enquanto o exercício em esteira suprimiu a ativação das células gliais, reduziu os níveis de BDNF e β -NGF, aumentou os níveis de IL-4, IL-1ra, IL-5 e reduziu os níveis de IL-1 β e TNF⁷. Esses resultados sugerem que a IL-4 medeia a analgesia produzida pelo exercício de baixa intensidade, por meio da modulação das respostas neuroimunes periféricas e centrais em camundongos com dor neuropática. Estes achados estão de acordo com outros trabalhos que demonstram que o exercício de intensidade moderada aumenta as concentrações de marcadores anti-inflamatórios como a IL-4.

A IL-10 foi identificada por Mosmann et al.¹¹³ em 1989 e inicialmente foi descrita como uma citocina inibitória da síntese e produção de citocinas sintetizadas por células Th1¹¹³. A IL-10 têm papel importante em uma ampla variedade de funções de inibição imunológica, ao se ligar no complexo receptor IL-10R α /IL-10R β ¹¹³, exercendo efeito anti-inflamatório com um papel na prevenção de doenças inflamatórias e autoimunes^{114,115}. A IL-10 é expressa por células Th1, Th2 e células TReg, células T CD8+ e células B. Também é expressa por células do sistema imunológico inato, incluindo células dendríticas,

macrófagos, mastócitos, células natural killer, eosinófilos e neutrófilos^{114,115}. Uma das funções da IL-10 é a ação anti-inflamatória mediada através da ligação com seu receptor e ativação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3). Os homodímeros STAT3 translocam-se no núcleo e ligam-se a elementos STAT em vários genes de resposta imunológica, incluindo a própria IL-10 e os genes supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3)¹¹⁶.

O estudo de Khan et al.¹¹⁶ (2021), mostra que os animais que realizaram exercício físico apresentaram hipoalgesia induzida por exercício e níveis mais altos de IL-10 no soro, nervo periférico e no gânglio sensorial do nervo espinal, após o esmagamento do nervo isquiático¹¹⁶. Foram utilizados ratos machos, que fizeram atividade física em uma haste giratória, em que andavam contra o movimento (Rotarod). Durante esse experimento os ratos ficavam nesse dispositivo por 180s, que incluía uma aceleração da velocidade de rotação de 8 a 16 rpm durante os primeiros 100 s, e uma velocidade constante de 16 rpm¹¹⁶. Como resultado os animais exercitados tiveram níveis mais elevados de IL-10 no nervo ciático afetado após lesão do nervo e níveis mais elevados de IL-10 de proteína e RNAm no gânglio sensorial do nervo espinal afetado e contralateral após a lesão, concluindo então que a citocina anti-inflamatória IL-10 pode ter papel protetor, inibindo o desenvolvimento da dor. Em resumo, a IL-10 é um importante supressor da resposta imunológica e uma peça-chave nas patologias e, portanto, um alvo terapêutico atraente, levantando assim questões importantes relacionadas com a sua modulação e chamando para mais pesquisas sobre a natureza pleiotrópica desta citocina¹¹⁶.

Em humanos, a dor neuropática está entre os tipos de dor crônica mais difíceis de tratar devido à sua complexa etiologia e ao envolvimento de vários sistemas neurotransmissores, receptores, canais iônicos e tipos de células¹¹⁷⁻¹¹⁹. Os fatores de crescimento (ou neurotrofinas) estão entre as primeiras moléculas a responderem à lesão do nervo e desencadeiam vários mecanismos que levam à dor neuropática¹²⁰, dessa forma, o entendimento do papel do exercício físico sobre os fatores de crescimento é de grande interesse para a neurociência da dor.

O BDNF é um membro da família das neurotrofinas, homólogos do NGF, neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4 (NT-4). O BDNF é encontrado em altas

concentrações no SNC, principalmente no hipocampo, córtex cerebral, hipotálamo e cerebelo^{121,122}. As cascatas de sinalização induzidas pelo BDNF são realizadas através do receptor cinase B da tropomiosina (TrkB) e do receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) de baixa afinidade^{121,122}. O BDNF desempenha um papel importante no crescimento, desenvolvimento e plasticidade adequados das sinapses glutamatérgicas e gabaérgicas, por meio da modulação da diferenciação neuronal e tem sido implicado no desenvolvimento e funcionamento neural, incluindo neurogênese, crescimento dendrítico, e potenciação de neurônios ao longo prazo¹²³. Em particular, o aumento da atividade do BDNF e do NGF participa da fisiopatologia da dor neuropática pela regulação positiva de vários genes relacionados à dor, potencializando a neurotransmissão glutamatérgica e ativação de células gliais no gânglio sensorial do nervo espinal e no corno dorsal da medula espinal^{124,125}.

Szuhany et al.¹²⁶ (2015), em sua revisão sistemática com meta-análise, utilizou 29 ensaios clínicos com humanos e determinou que uma única sessão de exercício físico, predominantemente aeróbio, tem um efeito moderado nos níveis de BDNF plasmático e sérico e esse efeito agudo é potencializado por um período anterior de treinamento regular. Além disso, indicou que o exercício regular intensifica o efeito de uma sessão de exercício nos níveis de BDNF¹²⁶.

Da mesma forma, a revisão sistemática com 55 estudos em humanos de Dinoff et al.¹²⁷ (2017), mostrou que as concentrações de BDNF no sangue aumentaram após o exercício físico com intensidade $\geq 40\%$ de consumo de oxigênio de pico (VO₂pico) ou descrito como corrida, ciclismo ou treinamento de resistência e há associação positiva entre a duração do exercício e os níveis de BDNF¹²⁷.

Modelos animais fornecem evidências consistentes sobre a regulação positiva de BDNF induzida pelo exercício físico, dada capacidade de medir o BDNF em estruturas do SNC e não apenas no plasma sanguíneo¹²⁸. O estudo de Almeida et al.¹²⁸ (2015), foi realizado com camundongos BALB/c machos com dor neuropática induzida pela ligadura do nervo isquiático. Os animais foram exercitados a partir do 7º dia pós-lesão, com um protocolo incremental de natação que iniciou com 10 min/dia, aumentando gradualmente até 50 min/dia, durante 5 semanas¹²⁸. Os resultados mostram que a alodinia mecânica foi

completamente revertida nesse período. O treinamento físico reverteu a expressão aumentada de BDNF no gânglio sensorial do nervo espinal e no nervo isquiático, após 5 semanas¹²⁸. Portanto pressupõe que os benefícios do exercício físico prolongado para a condição de dor crônica podem ser mediados por essas moléculas¹²⁸.

Cobianchi e colaboradores¹⁰³ realizaram treinamento físico em esteira 1 hora/dia, por 5 dias consecutivos, iniciando no 3º dia pós lesão em um modelo de dor neuropática em ratos fêmeas, induzido pela transecção do nervo isquiático. A corrida iniciou-se com velocidade normal de locomoção de 10 cm/s e foi aumentada 2 cm/s a cada 5 min, até a velocidade máxima de 32 cm/s¹⁰³. Nesse estudo foi analisado a expressão do RNAm de NGF, NT3, BDNF e GDNF no gânglio sensorial do nervo espinal e no corno anterior da medula espinal¹⁰³. A lesão aumentou significativamente a expressão de BDNF nos gânglio sensorial do nervo espinal e corno anterior da medula espinal e o exercício físico reduziu estes níveis no gânglio sensorial do nervo espinal¹⁰³. O grupo que realizou exercício físico, apresentou no corno anterior da medula espinal um aumento da expressão de RNAm de BDNF e NGF. A expressão aumentada desses fatores tróficos pode apoiar o recrescimento de neurônios motores e sensoriais que sofreram axonotmese¹⁰³.

O BDNF é bem conhecido por seu papel na modulação da dor, facilitando as respostas nociceptivas¹³⁰. Na periferia, o BDNF é liberado dos neurônios pelo gânglio sensorial do nervo espinal e células satélites, como as células de Schwann, enquanto no corno dorsal da medula espinal, o BDNF é liberado pelos terminais dos neurônios aferentes primários e pelas células gliais ativadas¹³⁰. Na medula espinal, o BDNF aumenta a excitabilidade do corno dorsal e facilita a transmissão da dor após lesão do nervo, modulando tanto a neurotransmissão glutamatérgica excitatória, quanto a neurotransmissão inibitória gabaérgica/glicinérgica¹³⁰.

De acordo com o que descrevemos anteriormente sobre a fisiopatologia da dor neuropática, sabemos que essa condição é uma das comorbidades mais incapacitantes o que interfere na qualidade de vida e gera um custo excessivo para a saúde¹⁰¹. Dessa forma, entender de maneira mais aprofundada o mecanismo neurobiológico e as interações neuroimunológicas de terapias não

farmacológicas, como o exercício físico, traria muitos benefícios para o tratamento e prevenção da dor neuropática de forma mais assertiva, reduzindo os gastos em saúde e medicamentos, sendo o exercício físico uma alternativa acessível e segura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o bloqueio dos receptores opioide sobre a ação do exercício físico de baixa intensidade nos componentes sensorial, cognitivo e emocional da dor neuropática após a lesão do nervo isquiático e verificar as interações dos receptores opioides com citocinas Th2 e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito exercício físico de baixa intensidade sobre a dor neuropática (aspectos cognitivo, emocional e sensorial) após a lesão do nervo isquiático.

Investigar o efeito do exercício físico sobre a ativação dos receptores opioides nos aspectos cognitivo, emocional e sensorial da dor neuropática após a lesão do SNP.

Avaliar a participação dos receptores opioides sobre as concentrações da IL-4 e IL-10 e BDNF no tronco encefálico e CPF após a lesão do nervo isquiático.

Quantificar a imunomarcção do receptor opioide μ no tronco encefálico e, CPF após a lesão do nervo isquiático.

Correlacionar a regulação da imunomarcção do receptor opioide μ ao padrão em citocinas Th2 e BDNF nas estruturas do SNC.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa é caracterizada como um estudo quantitativo experimental não-clínico. Este estudo foi escrito de acordo com as diretrizes do guia de reporte de estudos pré-clínicos denominado ARRIVE¹³¹ (do inglês, *Animals in Research: Reporting in vivo Experiments*).

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos utilizados serão listados a seguir, com seus respectivos fabricantes e locais de origem. Isoflurano (Isoforine®, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Balança de alta precisão (Shimadzu Corporation, Japão). Monofilamento de von Frey 0,6 g (VFH, Stoelting, IL, EUA). Caixa de acrílico com dimensões de 9 x 7 x 11 cm, com tampa e tela de arame com malha de 6 mm (70 x 40 cm) (Alumecril, São José, SC, Brasil); Aparato de acrílico, com três câmaras (câmaras 1 e 3 com 12,5 cm³ e a câmara 2 com 27 cm de comprimento) e probe de 2 mm e 5 mm (Alumecril, São José, SC, Brasil). Para os Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA) será utilizado: Tween® 20, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), aprotinina, cloreto de benzetônio e albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Kits de ELISA para camundongos (Human/Mouse BDNF – catalog number DY248; Mouse-IL4 – catalog number DY404; Mouse-IL10 – catalog number DY417; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e Leitor de placas (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China). Para o Western Blotting será utilizado: Tampão de lise RIPA, Ortovanadato de sódio, PMSF, Coquetel de inibidores de proteases e tampão Laemmli (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), membrana de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

EUA), Naloxona (NARCAN®, cloridrato de naloxona, kit de quimiluminescência (ECL; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA), fotodocumentador e software de aquisição das imagens (iBright Imaging Systems, iBright Analysis Software, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para as análises estatísticas será utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Arena de madeira com 40 x 40 x 30 cm. Software ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA).

3.3 ANIMAIS e CÁLCULO AMOSTRAL

Os experimentos foram conduzidos usando camundongos/Swiss, machos (35 a 45 g, 2 meses), obtidos do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil). Os animais foram alojados no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx), da Universidade do Sul de Santa Catarina, em sala aclimatada a 22 ± 2 °C, no ciclo 12 h-claro/escuro (luzes acesas às 6hs), com acesso a ração e água ad libitum.

A definição do tamanho amostral foi realizada através do cálculo estatístico, em uma amostra sem reposição. Utilizando a seguinte fórmula: $n = ((z \text{ alfa} + z \text{ beta}) * s) / \sigma)^2$. Com os valores da fórmula aplicado teremos: $n = ((1,96 + 1,28) * 35) / 40)^2 = 8$ animais por grupo para cada desfecho estudado. Um experimentador cegado distribuiu aleatoriamente os animais em cinco grupos experimentais: (1) Sham/Salina/Não-exercitado (n=8) (do inglês, *Sham/Saline/Non-exercised*); (2) Sham/Salina/Exercitado (n=8) (do inglês, *Sham/Saline/Exercised*); (3) Lesão do nervo/Salina/Não-exercitado (n=8) (do inglês, *Nerve injury/Saline/Non-exercised*); (4) Lesão do nervo/Salina/Exercitado (n=8) (do inglês, *Nerve injury/Saline/Exercised*) e (5) Lesão do nervo/Naloxona/Exercitado (n=8) (do inglês, *Nerve injury/Naloxone/Exercised*). Por fim, foram alojados aleatoriamente em caixas com número máximo de 20 animais em gaiola de polipropileno (49 x 34 x 16 cm) com grades de aço inoxidável e cama de maravalha.

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Para refinamento do modelo experimental, redução do sofrimento dos animais, como também manutenção do bem-estar animal, foi aplicada uma escala para verificação de sinais de estresse e dor, seguindo as diretrizes de Hawkins et al.¹³². Desta forma, se o animal apresentasse sinais de dor severa, trauma por automutilação, vocalização sem ser estimulado ou vocalização ao ser estimulado, seriam excluídos do estudo, aplicando-se a morte indolor assistida (MIA) de forma apropriada e eficaz, de acordo com os guias éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) descritos na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didático (DBCA). Ainda, utilizamos os seguintes parâmetros ou sinais de exclusão para a determinação de continuidade do uso do animal: apatia, sinais de infecção sistêmica (letargia, postura encurvada, aumento da frequência respiratória), aparecimento de crises convulsivas, inconformidades motoras, incapacidade de se mover dentro da caixa moradia, imobilidade mesmo ao ser estimulado, incapacidade de ingerir água e alimento - mesmo tendo acesso a esses recursos, 20 % de perda de peso comparado ao início do experimento ou desidratação (perda de turgor da pele após pinçamento) por mais de 48 h.

3.5 DELINIAMENTO DO ESTUDO

Os animais foram adaptados em esteira por 6 dias antes da cirurgia do nervo isquiático. Todos os grupos foram avaliados 24 h, antes da lesão do nervo para a detecção dos níveis basais de sensibilidade ao estímulo mecânico (teste de von Frey) e do comportamento cognitivo relacionada à dor, pelo teste de esquiva ao estímulo mecânico (do inglês, *Mechanical Conflict Avoidance System*, MCAS). Posteriormente, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de lesão do nervo isquiático e três dias após, foi iniciado o protocolo de exercício físico em esteira, por duas semanas. Após a lesão do nervo o teste de von Frey foi realizado todos, durante as duas semanas. O teste de campo aberto foi realizado no 13^o dia após a lesão. O teste de esquiva ao estímulo mecânico, foi realizado novamente, no 14^o dia após lesão nervosa,

conforme demonstrado na Figura 3. Após, 24 h da última sessão exercício físico em esteira, no décimo quinto dia após a lesão, os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta de amostras do CPF e tronco encefálico para o Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA) e o ensaio de Western Blotting. Todas as avaliações comportamentais e bioquímicos do estudo foram realizadas por pesquisadores cegados quando a alocação dos animais nos grupos e ao tratamento recebido.

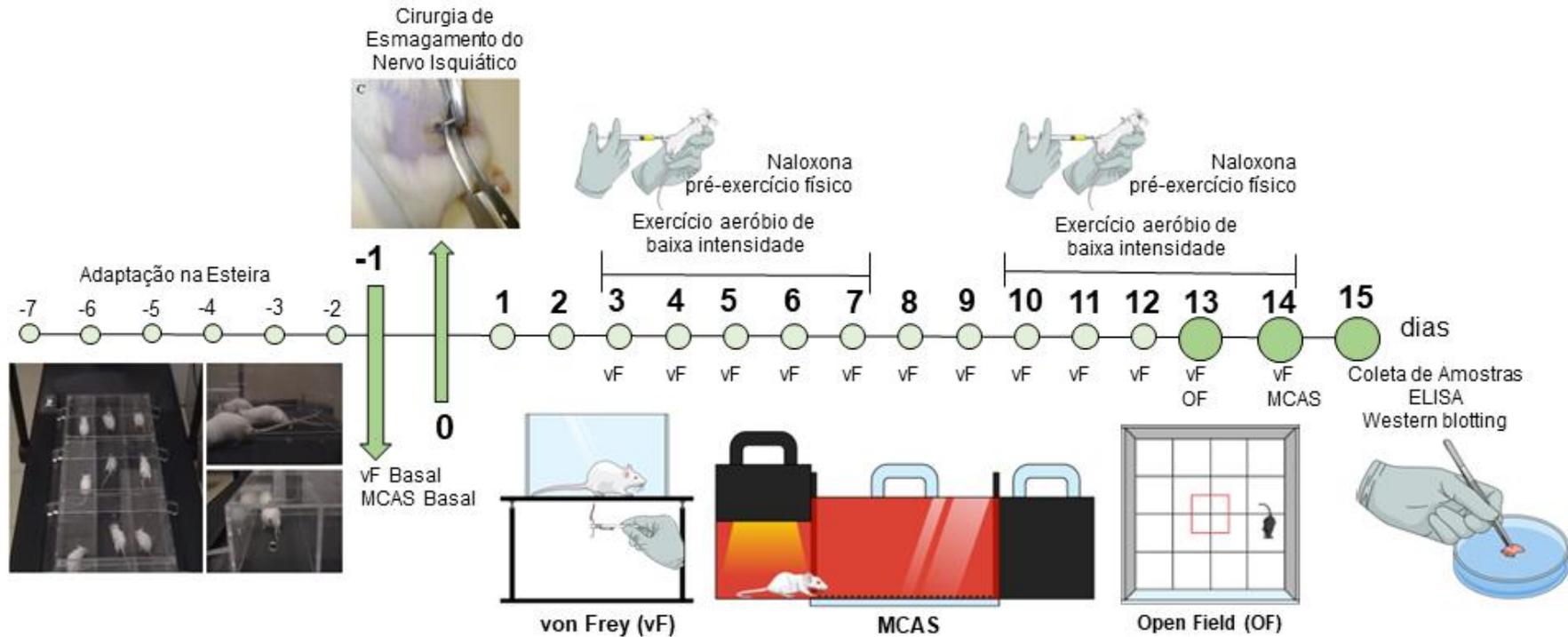


Figura 3. Desenho experimental.

Os animais foram adaptados ao protocolo de exercício em esteira e submetidos a cirurgia de nervo isquiático. A partir do 3º dia pós lesão iniciou-se o protocolo de administração da naloxona, seguida da sessão de exercício em esteira e da avaliação do componente sensorial da dor neuropática, pelo teste de von Frey (vF), até o 14º dia pós-esmagamento. No 13º dia foi realizada a avaliação do teste de campo aberto e no 14º dia o teste de esquiva ao estímulo mecânico (*Mechanical Conflict Avoidance System*, MCAS). A coleta das amostras foi realizada no 15º dia pós lesão, para realização do Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA) e Western Blotting.

3.5.1 Indução da lesão por esmagamento do nervo isquiático

Os animais foram previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) contendo xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/Kg). Após a verificação do estado de consciência do animal efetuou-se a tricotomia da área a ser operada. Em seguida, o animal foi mantido em aparato para manutenção da anestesia com isoflurano inalatório (1-2 % em 100 % de oxigênio). Foi então, realizada uma incisão curvilínea na coxa direita e a exposição do nervo isquiático foi conseguida após a divulsão dos músculos semitendíneo e reto femoral. Com o auxílio de uma pinça hemostática não serrilhada, foi realizado o esmagamento do nervo isquiático direito por 30 seg, apertando até o primeiro estágio da gramalheira da pinça, aproximadamente 10 mm acima da trifurcação do nervo¹³³. Logo após, a pele foi reparada com dois pontos de sutura com fio absorvível (Ethicon, 4-0) e realizada a assepsia no local com antisséptico (Povidine®). Após a cirurgia, os animais permaneceram próximos a uma fonte de calor até retornarem a deambular pela caixa, voltando então ao biotério do laboratório. O procedimento cirúrgico para o esmagamento do nervo isquiático foi realizado sempre pela mesma pesquisadora, para que fosse seguido o mesmo padrão em todos os procedimentos.

3.5.2 Protocolo de exercício físico aeróbio de baixa intensidade

Os animais foram habituados na esteira durante seis dias antes da cirurgia de nervo isquiático, 5 min por dia, a uma velocidade de 10 m/min, minimizando os efeitos do estresse em ambiente diferente. O exercício foi realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos, com 12 raias individuais (25 x 10 x 9,5 cm) de acrílico. O protocolo consistiu em corrida na esteira por 30 min por dia a uma velocidade de 10 m/min, sem inclinação, 5 por semana, durante 2 semanas. Esse programa de exercício físico é aeróbio, de baixa intensidade, realizado a 75 % da carga da máxima fase estável do lactato¹¹. O tratamento com exercício físico iniciou no terceiro dia após a lesão do nervo. Os animais dos

grupos não treinados: *Sham/Saline/Non-Exercised* e *Nerve injury/Saline/Non-Exercised* foram apenas manipulados e colocados na esteira (sem movimento), pelo mesmo tempo.

3.5.3 Investigação do sistema opioide no efeito do exercício físico

Para investigar a participação dos receptores opioides no efeito analgésico induzido pelo exercício físico os camundongos foram pré-tratados com o antagonista não seletivo de receptores opioides, naloxona (5 mg/kg) (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, São Paulo, Brazil) ou salina (10 ml/kg) por via subcutânea, diariamente, antes de cada sessão de exercício físico, durante as duas semanas do protocolo. A morfina (5 mg/kg, via subcutânea) (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, São Paulo, Brazil) foi utilizada como controle para observar se a dose de naloxona era capaz de antagonizar o seu efeito analgésico (Fig. Suplementar 1). Decorridos 30 min dos tratamentos com naloxona, salina ou morfina, foi realizado uma sessão de exercício físico de acordo com o protocolo descrito anteriormente. Trinta min após a sessão de exercício foi avaliada a hiperalgesia mecânica. Essa investigação foi realizada diariamente, por duas semanas após a lesão do nervo. Os grupos utilizados para esse experimento foram: (1) *Sham/Saline/Non-Exercised*; (2) *Sham/Saline/Exercised*; (3) *Nerve injury/Saline/Non-Exercised*; (4) *Nerve injury/Saline/Exercised* e (5) *Nerve injury/Naloxone/Exercised*; por fim, dois grupos controle (6) *Nerve injury/Morphine* e (7) *Nerve injury/Naloxone/Morphine*.

3.5.4 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando o monofilamento de von Frey, com carga de 0,6 g¹¹. Foi observada a frequência de resposta (em porcentagem) de retirada da pata posterior direita, frente à 10 aplicações dos filamentos. Para o teste os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre uma plataforma com malha de arame de 6 mm (70 x 40 cm), para permitir o acesso à superfície plantar da pata direita dos animais. O teste consistiu na

aplicação do filamento de von Frey (durante 5 seg) perpendicularmente à superfície plantar da pata posterior direita. A resposta de retirada da pata foi considerada positiva quando o animal removia totalmente a pata da tela de apoio.

3.5.5 Teste de esquiva ao estímulo mecânico

O *Mechanical Conflict-Avoidance System* avaliou o componente cognitivo relacionado à dor no modelo de esmagamento do nervo isquiático. O teste foi realizado em um aparato que contém duas câmaras de acrílico vermelho transparente e uma de acrílico preto. A câmara 1 de 12,5 cm³, é iluminada com LED, servindo como um estímulo aversivo, a fim de incentivar a "fuga" do animal para as câmaras escuras. Essa câmara iluminada com luz de LED é separada do restante da unidade por uma barreira móvel. A câmara 2 é a câmara de passagem com 27 cm de comprimento que liga as câmaras 1 e 3. A câmara 3 é totalmente escura, também com 12,5 cm³ é escura e fica na extremidade oposta à câmara 1. O piso da câmara 2 do aparato é composto por piso de acrílico liso ou acoplado a sondas de aço de aproximadamente 0,5 mm de diâmetro que são ajustadas para 2 mm ou 5 mm de altura, as quais promovem um estímulo mecânico nociceptivo nas patas dos animais. Para o teste, os animais foram colocados na câmara 1 com a barreira fechada. O LED foi ligado após 15 s e a barreira foi removida 20 s depois. O tempo que os animais levaram para sair da câmara 1, cruzarem a plataforma com as sondas de aço e entrarem com as quatro patas na câmara 3 foi utilizado como medida de resultado, e expresso como a latência (s)¹³⁴.

3.5.6 Teste do campo aberto

Para verificar a função locomotora dos animais, e relacioná-la ao comportamento de dor espontânea e ao componente emocional da dor, foi realizado o teste do campo aberto¹³⁵. O aparato consiste em uma arena quadrada de madeira com 40 x 40 x 40 cm de dimensões. Os animais foram colocados individualmente no

centro do aparato, permitindo que explorassem livremente por um período de 5 min. O comportamento exploratório do animal foi filmado e foi avaliada a distância total de locomoção percorrida (em metros), número de entradas no centro e o tempo permanecido dentro do centro do aparato (em s) utilizando-se o software ANYmaze® (Stoelting, USA). O aparato foi limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes, a fim de evitar indícios de odor animal.

3.5.7 Ensaios bioquímicos

Aproximadamente 24 horas após a última avaliação comportamental, no 15º dia após a lesão do nervo isquiático, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) contendo xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/Kg) e eutanasiados por decapitação, para retirada das amostras do tronco encefálico e CPF, para realização dos ensaios bioquímicos de ELISA e Western Blotting. Após a dissecação as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente estocadas em freezer -80 °C até a realização das análises.

3.5.7.1 Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima

Para a avaliação dos níveis de IL-4, IL-10 e do BDNF foi utilizada a metodologia previamente descrita⁷. As amostras foram homogeneizadas com a utilização de um pistilo em tampão de salina fosfato, contendo: Tween 20 (0,05 %), cloreto de benzetônio (0,1 mM), EDTA (10 mM), NaCl (0,4 mM), aprotinina A (2 µg/ml), PMSF (0,1 mM) e albumina sérica bovina (BSA) (0,5 %). Posteriormente os homogenatos foram centrifugadas a 3000 × g, por 10 min, a 4 °C para a retirada do sobrenadante, que foi utilizado para o ensaio. Os níveis das interleucinas e do BDNF foram analisados por meio de kits de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) para camundongos de acordo com as recomendações do fabricante. O conteúdo proteico foi mensurado pelo método de Bradford¹³⁶. As concentrações foram expressas em pg de citocina/mg de proteína.

3.5.7.2 Western blotting

O ensaio de *Western blotting* foi utilizado para a quantificação do imunoconteúdo de receptores opioides μ . As amostras foram homogeneizadas com a utilização de um pistilo e incubadas em tampão de lise RIPA com coquetel de inibidores de proteases 1 %, centrifugadas à 6000xg por 20 min (4 °C) e o sobrenadante foi recolhido. O conteúdo proteico foi mensurado pelo método de Bradford¹³⁶. Alíquotas de proteína total (20 μ g) foram fervidas a 95 °C por 5 min em 25 % do volume em tampão Laemmli. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 %. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, que foi bloqueada e incubada (4° C) com os anticorpos primários: Rabbit anti- μ opioid receptor (1: 5000, AB1580-I, Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e Mouse monoclonal Anti- β -Actin-Peroxidase (1:45,000; A3854, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), utilizado como controle. Depois de lavadas as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase em temperatura ambiente por uma hora. Após esse período, foi realizada a exposição das membranas ao kit de quimiluminescência (ECL) e revelação através de um fotodocumentador (iBright Imaging Systems, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa do próprio fotodocumentador (iBright Analysis Software, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a β -actina e expressos graficamente como unidades arbitrárias.

3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo.

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de Utilização
Hiperalgisia Mecânica (componente sensorial da dor neuropática)	Dependente	Quantitativa	Média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (% de resposta)
Componente cognitivo da dor neuropática	Dependente	Quantitativa	Média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (tempo em s)
Componente emocional da dor neuropática	Dependente	Quantitativa	Média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (distância percorrida em metros)
Níveis de Citocinas (IL-4 e IL-10) e do BDNF	Dependente	Quantitativa	Média e Desvio Padrão ou mediana e intervalo interquartil (pg de citocina/mg de proteína)
Imunoconteúdo de Receptores opioides μ	Dependente	Quantitativa	Média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (unidades arbitrárias)
Intervenção Exercício Aeróbico em Esteira	Independente	Qualitativo	Sim/Não (grupos exercitado e não exercitado)
Modelo de dor neuropática	Independente	Qualitativo	Sim/Não (grupos lesionado e não-lesionado)

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

Os resultados foram analisados no programa *Graph Pad Prism* na versão 8.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Foi avaliado a distribuição dos dados por meio do teste de *Shapiro – Wilk*. Os resultados paramétricos foram apresentados como média \pm DP. Os dados foram comparados usando análise de variância (ANOVA) duas vias, seguido de teste *post-hoc* de Tukey. Para analisar a correlação entre

os níveis teciduais de BDNF, IL-10 e IL-4 e a imunomarcção de receptores opioides μ , foi utilizado o teste de correlação de Pearson. A intensidade de correlação será interpretada dentro do intervalo de -1 até +1. Considerando correlação positiva forte os valores entre 0,70 a 1,0 moderada entre 0,3 a 0,7 e fraca de 0 a 0,3. Ainda, correlação negativa forte com valores entre -0,70 a -1,0, moderada entre -0,3 a -0,7 e fraca de 0 a -0,3. Em todas as análises, valores de P menores que 0,05 serão considerados estatisticamente significativos.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi enviado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina e registrado com o nº 21.004.4.01.IV, com parecer aprovado (ANEXO A). Foi seguido o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes, estando de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) descritos na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos (DBCA). O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foi o mínimo necessário para demonstrar os efeitos do exercício físico sobre as interações neuroimunes entre o sistema opioide e citocinas Th2 e o BDNF, e suas consequências na dor e neuroinflamação, após a lesão do SNP. Após a parte experimental comportamental foi realizada a indução da MIA, de acordo com a resolução 1000, 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária, sob supervisão de médico veterinário responsável.

4 ARTIGO

Blockade of μ -opioid receptors prevents the effect of low-intensity physical exercise on neuropathic pain in mice and promotes immunoregulation of Th2 cytokine and BDNF concentrations in the brainstem and prefrontal cortex

Fernanda Belle, ^a Elisa Mitkus Flores Lins, ^a Josiel Mileno Mack, ^{a,b,c} Francielly Suzaine da Silva, ^a Ludmilla Solange Gelain, ^{a,c} Verônica Vargas Horewicz, ^a Guilherme de Azevedo Traebert, ^{a,c} Alexandre Carlos Buffon, ^a Deborah de Camargo Hizume-Kunzler, ^d Daniel Fernandes Martins ^a e Franciane Bobinski ^{a*}

^a Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, Brasil.

^b Departamento de Clínica Médica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^c Faculdade de Medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, Brasil.

^d Departamento de Fisioterapia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

* Corresponding Author: Laboratório de Neurociência Experimental – LaNEx, Universidade do Sul de Santa Catarina, Pedra Branca, Palhoça, Brasil.

Endereço de e-mail: franciane.bobinski@animaeducacao.com.br (F. Bobinski).

ABSTRACT

Physical exercise reduces neuropathic pain, however, its interactions between the immune and opioidergic systems in the supraspinal structures are not well elucidated. Our objective was to evaluate the blockade of opioid receptors in the action of low-intensity physical exercise on the sensory, cognitive and emotional components of neuropathic pain after sciatic nerve injury and to verify the interactions of the opioid receptors with Th2 cytokines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). This is an experimental study that used the sciatic nerve crush model in mice, submitted to a protocol of physical exercise on a treadmill for 2 weeks, using pre-treatment of the animals exercised with naloxone. The sensory, cognitive and emotional components of the animals were evaluated, respectively, by the von Frey test, the Mechanical Conflict Prevention System (MCAS) and the open field test. On the 15th day after injury, brainstem and prefrontal cortex (PFC) samples were used for the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), which measured interleukins (IL)-4, IL-10 and BDNF, and for the Western blotting assay, which quantified the immunocontent of μ receptors. The reduction in mechanical hyperalgesia and escape latency in MCAS was prevented by pretreatment with naloxone. However, physical exercise and pre-administration of naloxone did not alter the reduction in exploration in the center of the open field. Physical exercise reduced the concentrations of IL-4, IL-10 and BDNF in the PFC and also of BDNF in the brainstem, and pre-treatment with naloxone prevented the reduction of BDNF and IL-4 in the PFC.

Keywords: Physical exercise. Neuropathic pain. Cytokines. Opioid receptor. Brainstem. Prefrontal cortex

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo demonstrou que a lesão por esmagamento do nervo isquiático induziu a hiperalgesia mecânica e confirmou o papel do sistema opioide endógeno no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico de baixa intensidade nos componentes sensorial e cognitivo relacionados a dor neuropática, demonstrando com isso o papel do sistema opioide sobre os componentes supra espinais da dor neuropática. O protocolo de exercício físico reduziu ainda as concentrações de IL-4, IL-10 e BDNF no CPF e ainda, de BDNF no tronco encefálico, e o pré-tratamento com naloxona preveniu a redução de BDNF e IL-4 no CPF, mas não previne a redução de BDNF no tronco encefálico induzida pelo exercício físico de baixa intensidade após a lesão nervosa periférica. Investigamos ainda o efeito do exercício físico sobre os receptores opioides μ no tronco encefálico e CPF após a lesão, e não encontramos diferença induzida pelo esmagamento do nervo ou pelo exercício físico e ainda correlacionamos ainda, as concentrações de IL-4, IL-10 e BDNF com o imunoconteúdo de receptores opioides μ , porém não encontramos dados significativos em tronco encefálico e CPF.

Assim, nossos resultados demonstram que o exercício físico de baixa intensidade pode ser uma boa estratégia para o tratamento de dor neuropática, também em seres humanos, visto que ele age promovendo a ativação do sistema opioide regulando citocinas e BDNF no processo de dor neuropática.

Nosso estudo deixa algumas lacunas, como a falta de um grupo experimental apenas com o uso da naloxona, para entender seu efeito *per se* sobre os receptores opioides μ . Também acreditamos que o modelo de esmagamento do nervo isquiático, apesar de promover a dor neuropática, é autolimitado pelo processo de regeneração que se inicia logo após a lesão, além de poder causar uma hipotalgesia causada pelo prejuízo motor, dificultando que seja possível verificar o quadro algico já nos primeiros dias após a lesão. Por fim, há ainda a necessidade de investigação em camundongos fêmeas, afinal, as funções fisiológicas e patológicas são influenciadas pelo sexo e existem

diferenças na reprodução de tratamentos em humanos, além do que, existe maior prevalência de casos de dor neuropática em indivíduos do sexo feminino.

REFERÊNCIAS

1. Malcangio M. Role of the immune system in neuropathic pain. *Scand J Pain*. 2019;1–5.
2. Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Vol. 155, Pain*. 2014. p. 654–62.
3. Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*. 2008;136(3):380–7.
4. Schaefer C, Sadosky A, Mann R, Daniel S, Parsons B, Tuchman M, et al. Pain severity and the economic burden of neuropathic pain in the United States: BEAT Neuropathic Pain Observational Study. *Clin Outcomes Res*. 2014;6:483–96.
5. Plein LM, Rittner HL. Opioids and the immune system – friend or foe. *Br J Pharmacol*. 2018;175(14):2717–25.
6. Law LF, Sluka KA. How does physical activity modulate pain? *Pain*. 2017;158(3):369–70.
7. Bobinski F, Teixeira JM, Sluka KA, Santos ARS. Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. *Pain*. 2018;159(3):437–50.
8. Bobinski F, Ferreira TAA, Córdova MM, Dombrowski PA, Da Cunha C, Santo CCDE, et al. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. *Pain*. 2015;156(12):2595–606.
9. Palandi J, Bobinski F, de Oliveira GM, Ilha J. Neuropathic pain after spinal cord injury and physical exercise in animal models: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2020;108:781–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.016>
10. Hoeger Bement MK, Sluka KA. Low-intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner. *Arch Phys Med*

- Rehabil. 2005;86(9):1736–40.
11. Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LGA, et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience*. 2011;194:337–48.
 12. Sacerdote P, Manfredi B, Gaspani L, Panerai AE. The opioid antagonist naloxone induces a shift from Type 2 to Type 1 cytokine pattern in BALB/cJ mice. *Blood*. 2000;95(6):2031–6.
 13. Heijnen CJ, Kavelaars A, Ballieux RE. β -Endorphin: Cytokine and Neuropeptide. *Immunol Rev*. 1991;119(1):41–63.
 14. Van Den Bergh P, Rozing J, Nagelkerken L. Identification of distinct sites of beta-endorphin that stimulate lymphokine production by murine CD4+T cells.pdf. *Lymphokine Cytokine Res.*; 1994. p. 13(2):63-9.
 15. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677–86.
 16. Van Den Bergh P, Rozing J, Nagelkerken L. β -Endorphin Stimulates Ia Expression on Mouse B Cells by Inducing Interleukin-4 Secretion by CD4+ T Cells. Vol. 149, *Cellular Immunology*. 1993. p. 180–92.
 17. Sacerdote P, Bianchi M, Panerai AE. Involvement of β -endorphin in the modulation of paw inflammatory edema in the rat. *Regul Pept*. 1996;63(2–3):79–83.
 18. Sacerdote P, Di San Secondo VEMR, Sirchia G, Manfredi B, Panerai AE. Endogenous opioids modulate allograft rejection time in mice: Possible relation with Th1/Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1998;113(3):465–9.
 19. Kraus J, Börner C, Giannini E, Hickfang K, Braun H, Mayer P, et al. Regulation of μ -Opioid Receptor Gene Transcription by Interleukin-4 and Influence of an Allelic Variation within a STAT6 Transcription Factor Binding Site. *J Biol Chem*. 2001;276(47):43901–8.
 20. Liu T, Gao YJ, Ji RR. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neurosci Bull*. 2012;28(2):131–44.
 21. Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A β (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary

- murine microglia and a human monocyte cell line. *J Neuroimmunol.* 2001;113(1):49–62.
22. Lovett-Racke AE, Smith ME, Arredondo LR, Bittner PS, Ratts RB, Shive CL, et al. Developmentally regulated gene expression of Th2 cytokines in the brain. *Brain Res.* 2000;870(1–2):27–35.
 23. De-Fraja C, Conti L, Magrassi L, Govoni S, Cattaneo E. Members of the JAK/STAT proteins are expressed and regulated during development in the mammalian forebrain. *J Neurosci Res.* 1998;54(3):320–30.
 24. Posso I, Araújo CP, Vieira E. Epidemiology of neuropathic pain. *Rev Dor.* 2016;17:11–4.
 25. Schmid DB, Salyapongse AN. Nerve injury and repair. *Curr Orthop Pract.* 2008;19(5):475–80.
 26. Siqueira JLD, Morete MC. Psychological assessment of patients with chronic pain: when, how and why refer? *Rev da Dor.* 2013;16:11–2.
 27. Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: Do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 2003;26(12):696–705.
 28. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain.* 2009 Sep;10(9):895–926.
 29. Gold MS, Levine JD, Correa AM. Modulation of TTX-R I(Na) by PKC and PKA and their role in PGE2- induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci.* 1998;18(24):10345–55.
 30. Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(7):533–48.
 31. Moore KW, Malefyt RDW, Robert L, Garra AO. Interleukin -10 and the Interleukin -10. *Mol Cell Biol.* 2001;1(1):683–765.
 32. Amaya F, Izumi Y, Matsuda M, Sasaki M. Tissue Injury and Related Mediators of Pain Exacerbation. *Curr Neuropharmacol.* 2013;11(6):592–7.
 33. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, et al. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell.* 2006;124(6):1269–82.

34. Cummins TR, Waxman SG, Wood JN. Sodium channels and pain. *Oxford Handb Neurobiol Pain*. 2018;233–62.
35. Eijkemans M, Mommers M, Draaisma JMT, Thijs C, Prins MH. Physical Activity and Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2012;7(12).
36. Ji RR, Gereau IV RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):135–48.
37. Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci*. 1999;19(6):2181–6.
38. Amaya F, Oh-Hashi K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, et al. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res*. 2003;963(1–2):190–6.
39. Moore C, Gupta R, Jordt SE, Chen Y, Liedtke WB. Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neurosci Bull*. 2018;34(1):120–42.
40. Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci*. 2004;74(21):2643–53.
41. Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*. 2002;36(1):57–68.
42. Amaya F, Shimosato G, Nagano M, Ueda M, Hashimoto S, Tanaka Y, et al. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci*. 2004;20(9):2303–10.
43. Amaya F, Decosterd I, Samad TA, Plumpton C, Tate S, Mannion RJ, et al. Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. *Mol Cell Neurosci*. 2000;15(4):331–42.
44. Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*. 2007;10(11):1361–8.
45. Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*. 2010;16(11):1267–76.
46. Shibasaki M, Sasaki M, Miura M, Mizukoshi K, Ueno H, Hashimoto S, et al. Induction of high mobility group box-1 in dorsal root ganglion

- contributes to pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *Pain*. 2010;149(3):514–21.
47. Shi Y, Gelman BB, Lisinicchia JG, Tang SJ. Chronic-pain-associated astrocytic reaction in the spinal cord dorsal horn of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Neurosci*. 2012;32(32):10833–40.
 48. Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain*. 2013;154(SUPPL. 1):10–28.
 49. Huang T, Leda M, Cherkas P. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by. *Science (80-)*. 2002;114:279–83.
 50. Inoue K, Tsuda M. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci*. 2018 Mar;19(3):138–52.
 51. Chen G, Xie RG, Gao YJ, Xu ZZ, Zhao LX, Bang S, et al. β -Arrestin-2 regulates NMDA receptor function in spinal lamina II neurons and duration of persistent pain. *Nat Commun*. 2016;7:1–12.
 52. Colburn RW, DeLeo JA. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Brain Res Bull*. 1999;49(6):419–27.
 53. Chen G, Park CK, Xie RG, Berta T, Nedergaard M, Ji RR. Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. *Brain*. 2014;137(8):2193–209.
 54. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003;424(6950):778–83.
 55. Kobayashi K, Yamanaka H, Fukuoka T, Dai Y, Obata K, Noguchi K. P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J Neurosci*. 2008;28(11):2892–902.
 56. Kobayashi K, Takahashi E, Miyagawa Y, Yamanaka H, Noguchi K. Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett*. 2011;504(1):57–61.
 57. Clark A, Staniland A, Malcangio M. Fractalkine/CX3CR1 signalling in chronic pain and inflammation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12:1707–14.

58. Crombie KM, Brellenthin AG, Hillard CJ, Koltyn KF. Endocannabinoid and opioid system interactions in exercise-induced hypoalgesia. *Pain Med (United States)*. 2018;19(1):118–23.
59. Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, et al. Regional μ opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science (80-)*. 2001;293(5528):311–5.
60. Zubieta JK. Forebrain opiates. Ed.1. Basbaum AI, Bushneel MC, editors. Amsterdam: Science of Pain; 2008. 821–831 p.
61. Reinscheid RK, Ardati A, Monsma FJ, Civelli O. Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptide orphanin FQ. *J Biol Chem*. 1996;271(24):14163–8.
62. Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, et al. μ -opioid Receptor-Mediated Antinociceptive Responses Differ in Men and Women. *J Neurosci*. 2002;22(12):5100–7.
63. Bencherif B, Fuchs PN, Sheth R, Dannals RF, Campbell JN, Frost JJ. Pain activation of human supraspinal opioid pathways as demonstrated by [^{11}C]-carfentanil and positron emission tomography (PET). *Pain*. 2002;99(3):589–98.
64. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*. 1984;VOL. 7:309–38.
65. Bloom FE, Rossier J, Battenberg ELF, Bayon A, French E, Henriksen SJ, et al. β -Endorphin: cellular localization, electrophysiological and behavioral effects. *Endorphins Ment Heal Res*. 1994;pp 17-29.
66. Lazarus LH, Ling N, Guillemin R. β Lipotropin as a prohormone for the morphinomimetic peptides endorphins and enkephalins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(6):2156–9.
67. Arvidsson U, Dado RJ, Riedl M, Lee JH, Law PY, Loh HH, et al. δ -Opioid receptor immunoreactivity: Distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. *J Neurosci*. 1995;15(2):1215–35.
68. Polter AM, Barcomb K, Chen RW, Dingess PM, Graziane NM, Brown TE, et al. Constitutive activation of kappa opioid receptors at ventral tegmental

- area inhibitory synapses following acute stress. *Elife*. 2017;6:1–33.
69. Zhou HY, Chen SR, Chen H, Pan HL. Opioid-induced long-term potentiation in the spinal cord is a presynaptic event. *J Neurosci*. 2010;30(12):4460–6.
 70. Corder G, Doolen S, Donahue RR, Winter MK, Jutras BL, He Y, et al. Constitutive μ -opioid receptor activity leads to long-term endogenous analgesia and dependence. *Science* (80-). 2013;341(6152):1394–9.
 71. Yao XQ, Malik RU, Griggs NW, Skjærven L, Traynor JR, Sivaramakrishnan S, et al. Dynamic coupling and allosteric networks in the α subunit of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem*. 2016;291(9):4742–53.
 72. Kenakin T. Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J*. 2001;15(3):598–611.
 73. Valentino RJ, Volkow ND. Untangling the complexity of opioid receptor function. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2018;43(13):2514–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41386-018-0225-3>
 74. Rusin KI, Giovannucci DR, Stuenkel EL, Moises HC. κ -Opioid receptor activation modulates Ca^{2+} currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals. *J Neurosci*. 1997;17(17):6565–74.
 75. Altier C, Khosravani H, Evans RM, Hameed S, Peloquin JB, Vartian BA, et al. ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nat Neurosci*. 2006;9(1):31–40.
 76. Mathers C, Stevens G, Mascarenhas M. Global health risks who mortality and burden of disease attributable to selected major risks. 2009. 1–70 p.
 77. Bruehl S, Burns JW, Koltyn K, Gupta R, Buvanendran A, Edwards D, et al. Are endogenous opioid mechanisms involved in the effects of aerobic exercise training on chronic low back pain? A randomized controlled trial. *Pain*. 2020;161(12):2887–97.
 78. Saanijoki T, Tuominen L, Tuulari JJ, Nummenmaa L, Arponen E, Kalliokoski K, et al. Opioid release after high-intensity interval training in healthy human subjects. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(2):246–54.
 79. Landmark T, Romundstad P, Borchgrevink PC, Kaasa S, Dale O. Associations between recreational exercise and chronic pain in the

- general population: Evidence from the HUNT 3 study. *Pain*. 2011;152(10):2241–7.
80. Brosseau L, Taki J, Desjardins B, Thevenot O, Fransen M, Wells GA, et al. The Ottawa panel clinical practice guidelines for the management of knee osteoarthritis. Part two: Strengthening exercise programs. *Clin Rehabil*. 2017;31(5):596–611.
 81. Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Veiga FH, Ferreira SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *Br J Pharmacol*. 1999;126(1):45–50.
 82. Geneen LJ, Moore RA, Clarke C, Martin D, Colvin LA, Smith BH. Physical activity and exercise for chronic pain in adults: An overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;1.
 83. Busch AJ, Webber SC, Brachaniec M, Bidonde J, Bello-Haas VD, Danyliw AD, et al. Exercise therapy for fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep*. 2011;15(5):358–67.
 84. Sluka KA, Frey-Law L, Hoeger Bement M. Exercise-induced pain and analgesia? Underlying mechanisms and clinical translation. *Pain*. 2018;159(9):S91–7.
 85. Bidonde J, Aj B, Cl S, Tj O, Sy K, Sm G, et al. Aerobic exercise training for adults with fibromyalgia (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;(6).
 86. Landmark T, Romundstad PR, Borchgrevink PC, Kaasa S, Dale O. Longitudinal Associations between Exercise and Pain in the General Population - The HUNT Pain Study. *PLoS One*. 2013;8(6):4–9.
 87. Brito RG, Rasmussen LA, Sluka KA. Regular physical activity prevents development of chronic muscle pain through modulation of supraspinal opioid and serotonergic mechanisms. *Pain Reports*. 2017;2(5):1–12.
 88. Hoffmann P, Terenius L, Thorén P. Cerebrospinal fluid immunoreactive β -endorphin concentration is increased by voluntary exercise in the spontaneously hypertensive rat. *Regul Pept*. 1990;28(2):233–9.
 89. Chuganji S, Nakano J, Sekino Y, Hamaue Y, Sakamoto J, Okita M. Hyperalgesia in an immobilized rat hindlimb: Effect of treadmill exercise using non-immobilized limbs. *Neurosci Lett*. 2015;584:66–70.

90. Parent-Vachon M, Beaudry F, Carrier D, Di Cristo G, Vachon P. The Effects of Exercise on Pain and Reproductive Performance in Female Pregnant Mice With Neuropathic Pain. *Biol Res Nurs*. 2019;21(5):500–9.
91. Yoon HJ, Thakur V, Isham D, Fayad M, Chattopadhyay M. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. *Exp Neurol*. 2015;267:107–14.
92. Stagg NJ, Mata HP, Ibrahim MM, Henriksen EJ, Porreca F, Vanderah TW, et al. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: Role of endogenous opioids. *Anesthesiology*. 2011;114(4):940–8.
93. Girardot MN, Holloway FA. Cold water stress analgesia in rats: Differential effects of naltrexone. *Physiol Behav*. 1984;32(4):547–55.
94. Ribeiro F, Alves AJ, Teixeira M, Miranda F, Azevedo C, Duarte JA, et al. Exercise training increases interleukin-10 after an acute myocardial infarction: A randomised clinical trial. *Int J Sports Med*. 2012;33(3):192–8.
95. O'Connor P, Chipkin RE. Comparisons between warm and cold water swim stress in mice. *Life Sci*. 1984;35(6):631–9.
96. Yakeu G, Butcher L, Isa S, Webb R, Roberts AW, Thomas AW, et al. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: Roles of PPAR γ and Th2 cytokines. *Atherosclerosis*. 2010;212(2):668–73.
97. Munk PS, Breland UM, Aukrust P, Ueland T, Kvaløy JT, Larsen AI. High intensity interval training reduces systemic inflammation in post-PCI patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2011;18(6):850–7.
98. Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, Fernando F, Cavallo S, Cardelli P, et al. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;20(8):608–17.
99. Lima L V., Desantana JM, Rasmussen LA, Sluka KA. Short-duration physical activity prevents the development of activity-induced hyperalgesia through opioid and serotonergic mechanisms. Vol. 158, *Pain*. 2017. 1697–1710 p.

100. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(1):64–76.
101. Arbat-Plana A, Cobianchi S, Herrando-Grabulosa M, Undina E. Endogenous modulation of TrkB signaling by treadmill exercise after peripheral nerve injury. *Neuroscience.* 2017;Volume 340:188–200.
102. Chhaya SJ, Quiros-Molina D, Tamashiro-Orrego AD, Houlé JD, Detloff MR. Exercise-Induced Changes to the Macrophage Response in the Dorsal Root Ganglia Prevent Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 2019;36(6):877–90.
103. Cobianchi S, Marinelli S, Florenzano F, Pavone F, Luvisetto S. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience.* 2010;168(1):273–87.
104. Wakaizumi K, Kondo T, Hamada Y, Narita M, Kawabe R, Narita H, et al. Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with Gi-DREADD in mice. *Mol Pain.* 2016;12:1–2.
105. Yamaoka S, Oshima Y, Horiuchi H, Morino T, Hino M, Miura H, et al. Altered gene expression of RNF34 and PACAP possibly involved in mechanism of exercise-induced analgesia for neuropathic pain in rats. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1–19.
106. Kakanis MW, Peake J, Brenu EW, Simmonds M, Gray B, Marshall-Gradisnik SM. T helper cell cytokine profiles after endurance exercise. *J Interf Cytokine Res.* 2014;34(9):699–706.
107. Jonsdottir IH, Hoffmann P, Thoren P. Physical exercise, endogenous opioids and immune function. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1997;161(640):47–50.
108. Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE. Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *1982;155(March):914–23.*
109. Celik M, Labuz D, Keye J, Glauben R, Machelska H. IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids. *JCI Insight.*

- 2020;5(4):1–29.
110. Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. *J Immunol*. 2012;189(9):4213–9.
 111. MacHelska H. Dual peripheral actions of immune cells in neuropathic pain. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011;59(1):11–24.
 112. Ji RR, Chamessian A, Zhang YQ. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science (80-)*. 2016;354(6312):572–7.
 113. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145–73.
 114. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev*. 2008;223(1):114–31.
 115. Murray PJ. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6(4):379–86.
 116. Khan J, Wang Q, Ren Y, Eliav R, Korczeniewska OA, Benoliel R, et al. Exercise induced hypoalgesia profile in rats is associated with IL-10 and IL-1 β levels and pain severity following nerve injury. *Cytokine*. 2021;143:155–540.
 117. Siniscalco D, Giordano C, Rossi F, Maione S, de Novellis V. Role of Neurotrophins in Neuropathic Pain. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9(4):523–9.
 118. Truini A, Garcia-Larrea L, Cruccu G. Reappraising neuropathic pain in humans - How symptoms help disclose mechanisms. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(10):572–82.
 119. Udina E, Cobianchi S, Allodi I, Navarro X. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. *Ann Anat*. 2011;193(4):347–53.
 120. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther*. 2013;138(2):155–75.
 121. Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function,

- and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;220:223–50.
122. Walsh JJ, Tschakovsky ME. Exercise and circulating BDNF: Mechanisms of release and implications for the design of exercise interventions. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2018;43::1095-1104.
 123. McKelvey L, Shorten GD, O’Keeffe GW. Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management. *J Neurochem*. 2013;124(3):276–89.
 124. Vivoli E, Di Cesare Mannelli L, Salvicchi A, Bartolini A, Koverech A, Nicolai R, et al. Acetyl-L-carnitine increases artemin level and prevents neurotrophic factor alterations during neuropathy. *Neuroscience*. 2010;167(4):1168–74.
 125. Ossipov MH. Growth factors and neuropathic pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2011;15(3):185–92.
 126. Szuhany KL, Bugatti M, Otto MW. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *J Psychiatr Res*. 2015;60:56–64.
 127. Dinoff A, Herrmann N, Swardfager W, Lanctôt KL. The effect of acute exercise on blood concentrations of brain-derived neurotrophic factor in healthy adults: a meta-analysis. Vol. 46, *European Journal of Neuroscience*. 2017. 1635–1646 p.
 128. Almeida C, DeMaman A, Kusuda R, Cadetti F, Ravanelli M. Exercise therapy normalize BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. 2015. p. 504–13.
 129. Almeida C, Demaman A, Kusuda R, Cadetti F, Ravanelli MI, Queiroz AL, et al. Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. *Pain*. 2015;156(3):504–13.
 130. Fukagawa H, Koyama T, Kakuyama M, Fukuda K. Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *J Anesth*. 2013;27(1):93–7.
 131. Drummond GB, Paterson DJ, McGrath JC. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Exp Physiol*. 2010;95(8):842–4.

132. Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: Eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim.* 2011;45(1):1–13.
133. van der Wal S, Cornelissen L, Behet M, Vaneker M, Steegers M, Vissers K. Behavior of neuropathic pain in mice following chronic constriction injury comparing silk and catgut ligatures. *Springerplus.* 2015;4(1).
134. Shepherd AJ, Mohapatra DP. Pharmacological validation of voluntary gait and mechanical sensitivity assays associated with inflammatory and neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology.* 2018;130:18–29.
135. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2015;(96):1–6.
136. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May;72:248–54.

ANEXO A

ANEXO A – Parecer Comissão de Ética no Uso de Animais da Unisul (CEUA)



Pró Reitoria Acadêmica - PROAC
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 04 de março de 2021
Registro na CEUA Nº 21.004.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Franciane Bobinski

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Efeitos do exercício físico na dor neuropática e neuroinflamação induzida pela lesão nervosa periférica em camundongos: estudo do sistema opioide e sua relação com as citocinas th2", registrada com o nº 21.004.4.01.IV, sob a responsabilidade de Franciane Bobinski - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 08 de março de 2021.

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

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

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão



Pró Reitoria Acadêmica - PROAC
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 04 de março de 2021

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Efeitos do exercício físico na dor neuropática e neuroinflamação induzida pela lesão nervosa periférica em camundongos: estudo do sistema opioide e sua relação com as citocinas th2", registrada com o nº 21.004.4.01.IV, sob a responsabilidade de Franciane Bobinski - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 08 de março de 2021.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/05/2020 a 30/04/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ Swiss
Nº de animais	96
Peso/Idade	30 - 40 g/60 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério Central da UFSC

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão