



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
LUIZ AUGUSTO OLIVEIRA BELMONTE

**OS EFEITOS DA CORRIDA CONTÍNUA VERSUS INTERVALADA NA DOR PÓS
ISQUEMIA CRÔNICA DA PATA EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO MECANISMO DE
AÇÃO**

PALHOÇA
2018

LUIZ AUGUSTO OLIVEIRA BELMONTE

**OS EFEITOS DA CORRIDA CONTÍNUA VERSUS INTERVALADA NA DOR PÓS
ISQUEMIA CRÔNICA DA PATA EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DO MECANISMO DE
AÇÃO**

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

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

PALHOÇA

2018

B38 Belmonte, Luiz Augusto Oliveira, 1976 -

Os efeitos da corrida contínua versus intervalada na dor pós isquemia crônica da pata em camundongos : análise do mecanismo de ação / Luiz Augusto Oliveira Belmonte. – 2018.

139 f. : il. color. ; 30 cm

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

Orientação: Prof. Daniel Fernandes Martins

1. Dor crônica – Tratamento. 2. Dor – Tratamento. 3. Exercícios físicos. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.8491

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215



UNISUL

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

Os efeitos da corrida contínua versus intervalada na dor pós
isquemia crônica da pata em camundongos:
análise do mecanismo de ação

LUIZ AUGUSTO OLIVEIRA BELMONTE

AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 26 de fevereiro de 2018.

Doutor Daniel Fernandes Martins (orientador)

Doutor Luiz Guilherme Antonacci Guglielmo (avaliador externo - UFSC)

Doutor Rafael Cypriano Dutra (avaliador externo - UFSC)

Doutora Anna Paula Piovezan (avaliador interno)

Doutora Franciane Bobinski (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson Traebert

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

- Unisul – Universidade do Sul de Santa Catarina – Sede - Reitoria – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621-3000
- Campus Universitário de Tubarão – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621-3000
- Campus Universitário da Grande Florianópolis – Av. Pedra Branca, 25 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-272 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279-1000
- Campus Universitário UnisulVirtual – Av. dos Lagos, 41 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-100 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279-1242

Dedico este trabalho a minha família e
em especial a **Luana** e ao **Davi**

AGRADECIMENTOS

- São tantas pessoas para agradecer.... cada uma com um pedaço importante deste trabalho.
- Agradeço a UNISUL e a CAPES pela bolsa de estudos.
- A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), pelos momentos de aprendizagem.
- A Marcieli pela amizade e profissionalismo.
- Ao professor Dr. Rafael Cypriano Dutra por aceitar e engrandecer com o seu conhecimento nosso trabalho. Ao Professor Dr. Luiz Guilherme por me receber em seu laboratório, me auxiliar nas medições do lactato e participar da banca do trabalho.
- A prof^a Fabrícia Petronilho e toda sua equipe por toda sua ajuda.
- Ao grupo do Lanex: Thiago (parceiro especial), Daniela Ludtke, Aline Emmer, Ana Batisti, Amanda, Silvana, Leandro, Natália, Juliete, Kamila, Verônica... foram momentos muitos legais ao lado de vocês!!!
- A prof^a Dra. Anna Piovesan que me recebeu, me tranquilizou e me ensinou... um dia chego ao seu nível de gentileza!
- A prof^a Dra. Franciane Bobinski por todos os ensinamentos, por todas medições de precisão e pela parceria.
- Daiana Salm meu especial obrigado por tudo, por todas as cirurgias realizadas juntos... por todos os experimentos, pela amizade e pelo companheirismo...
- Bruninha por sua amizade e pelo profissionalismo nos experimentos, muito obrigado!
- Ao meu Pai que desde cedo me incentivou a ter curiosidade e incentivo ao estudo...
- A minha mãe! Que depois da sua ausência percebi o quanto sou parecido com ela...
- Aos amigos que sempre me incentivaram: Geraldo, Inês, Claiton
- A Luana pelo incentivo, pelo amor, pelo auxílio enfim, por tudo!!!
- Ao Davi pelo seu amor e pela paciência na minha ausência!
- Ao amigo e orientador Prof. Dr. Daniel. Aprendi muito contigo nestes anos, muito de ciência, determinação, rigor, trabalho... como é bacana conviver com alguém talentoso fazendo o que gosta!!! Minha eterna gratidão por tudo!! “És meu ídolo”, “És o cara”.

RESUMO

Introdução: O exercício físico é uma ferramenta importante e adjuvante no tratamento da dor crônica. É necessária a compreensão dos efeitos analgésicos em diferentes prescrições e suas repercussões no sistema nervoso central. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da corrida contínua e intervalada em esteira sobre a hiperalgesia mecânica em um modelo animal de dor pós isquemia crônica (DPIC), bem como analisar o mecanismo de ação deste efeito. **Métodos:** Diferentes grupos de camundongos Suíços machos com DPIC, induzida por 3 horas de isquemia da pata seguida por reperfusão (IR), correram na esteira em diferentes protocolos testando-se a velocidade (10, 13, 16 ou 19 m/min), duração (15, 30 ou 60 minutos), frequência semanal (3 ou 5 vezes), aumento semanal da velocidade da corrida contínua e intervalada. A hiperalgesia mecânica foi avaliada pelo filamento de von Frey em 7, 14 e 21 dias após IR da pata. No 11º dia após IR da pata e após 5 dias de corrida contínua e intervalada, dosagens das concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, peroxidação lipídica, proteínas carboniladas, atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no córtex pré-frontal, tronco encefálico e medula espinal foram realizadas. Além disso, quantificação da expressão de ERK 1/2 e AKT 1/2/3 na medula espinal foi realizada. O envolvimento dos receptores opioides foi investigado pela administração do antagonista (naloxona) opioide no 7º dia após IR da pata. **Resultados:** Os resultados demonstraram que a corrida contínua apresenta efeito anti-hiperalgésico dependente da intensidade e volume. A corrida intervalada apresenta efeito anti-hiperalgésico mais duradouro (por até 5 horas) que a corrida contínua. O efeito anti-hiperalgésico é dependente da intensidade e do volume na corrida contínua e o aumento da velocidade mantém o efeito anti-hiperalgésico em ambos protocolos. Os dois protocolos de corrida se encontraram no domínio moderado. No córtex pré-frontal somente a corrida intervalada diminuiu TNF- α e IL-6 e aumentou IL-10 e ambas aumentaram a SOD. No tronco encefálico e medula espinal ambas corridas diminuíram as concentrações de TNF- α e IL-6 e aumentaram IL-10. Ambos protocolos de corrida reduziram o dano oxidativo na medula espinal. Somente a corrida intervalada apresentou concentrações menores de ERK1/2 fosforilada na medula espinal. O sistema opioide participa do efeito anti-hiperalgésico induzida pela corrida contínua, mas não na intervalada. **Conclusão:** A corrida intervalada apresentou grande potencial anti-hiperalgésico com resultados mais promissores do que a corrida contínua, o que pode estar ao fato da corrida intervalada ativar diferentes mecanismos daqueles ativados pela corrida contínua. Assim, a corrida intervalada surge como uma alternativa importante para a prescrição de tratamentos adjuvantes em outros modelos animais e/ou em pacientes com dores crônicas.

Palavras-chave: DPIC; exercício físico; hiperalgesia mecânica; exercício intervalado.

ABSTRACT

Introduction: Physical exercise is an important and adjuvant tool in the treatment of chronic pain. It is necessary to understand the analgesic effects in different prescriptions and their repercussions in the central nervous system. **Objective:** To evaluate the effects of continuous and interval running on treadmill on mechanical hyperalgesia in an animal model of chronic post-ischemia pain (CPIP), as well as to analyze the mechanism of action of this effect. **Methods:** Different groups of male Swiss mice with CPIP, induced by 3 hours of paw ischemia followed by reperfusion (IR), ran on the treadmill in different protocols, the speed (10, 13, 16 or 19 m/min), duration (15, 30 or 60 minutes), weekly frequency (3 or 5 times), weekly increase in continuous and interval running speed, were tested. Mechanical hyperalgesia was evaluated by von Frey filament at 7, 14 and 21 days after paw IR. On the 11th day after paw IR and after 5 days of continuous and interval running, concentrations of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, lipid peroxidation, carbonylated proteins, activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase in the prefrontal cortex, brain stem and spinal cord were performed. In addition, quantification of ERK 1/2 and AKT 1/2/3 expression in the spinal cord was performed. Involvement of opioid receptors was investigated by administration of the opioid antagonist (naloxone) on the 7th day after paw IR. **Results:** The results showed that continuous running has antihyperalgesic effect dependent on intensity and volume. Interval running has a longer lasting antihyperalgesic effect (up to 5 hours) than continuous running. The antihyperalgesic effect is dependent on intensity and volume in continuous running and increasing speed maintains the antihyperalgesic effect in both protocols. Both running protocols were in the moderate domain. In the pre-frontal cortex only, the interval running decreased TNF- α and IL-6 and increased IL-10, both increased SOD. In the brainstem and spinal cord both runs decreased TNF- α and IL-6 levels and increased IL-10. Both running protocols reduced oxidative damage in the spinal cord. Only the interval running had lower concentrations of phosphorylated ERK 1/2 in the spinal cord. The opioid system participates in the antihyperalgesic effect induced by continuous running, but not in the interval running. **Conclusion:** Interval running presented a great antihyperalgesic potential with more promising results than continuous running, which may be due to the fact that the interval running can activate different mechanisms from those activated by continuous running. Thus, interval running appears as an important alternative for the prescription of adjuvant treatments in other animal models and/or in patients with chronic pain.

Keywords: CPIP; physical exercise; mechanical hyperalgesia; interval exercise.

LISTAS

Lista de quadros

Quadro 1- Descrição das variáveis do estudo.....	55
--	----

Lista de figuras

Figura 1- Representação esquemática das três fases do estudo.....	43
Figura 2- Representação gráfica dos tipos de corrida selecionadas na fase 3.....	45
Figura 3- Representação dos procedimentos de isquemia e reperfusão da pata direita posterior.....	46
Figura 4- Representação do ambiente de treinamento da corrida.....	48
Figura 5- Representação da avaliação da hiperalgesia mecânica por meio do filamento de von Frey	49
Figura 6- Efeito de diferentes velocidades da corrida contínua na hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR da pata.....	59
Figura 7- Efeito de diferentes volumes da corrida contínua na hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR.....	61
Figura 8- Efeito da frequência semanal da corrida contínua (16 m/min por 30 minutos) na hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR da pata.....	63
Figura 9- Efeito do aumento da velocidade da corrida contínua sobre a hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR da pata.....	65
Figura 10- Efeito da corrida intervalada com o aumento da velocidade sobre a hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR da pata.....	67
Figura 11- Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações de p-ERK1/2 na medula espinal dos animais no 11º dia após IR da pata.....	69
Figura 12- Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações da AKT1/2/3 na medula espinal dos animais no 11º dia após IR da pata.....	70
Figura 13- Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias dos animais no 11º dia após IR da pata.....	72
Figura 14- Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações de citocinas anti-inflamatórias dos animais no 11º dia após IR da pata.....	74
Figura 15- Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações Malondialdeído (MDA) e das proteínas carboniladas nos animais no 11º dia após IR da pata.....	76
Figura 16- Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT) nos animais no 11º dia após IR da pata	78
Figura 17- Avaliação da participação dos receptores opioidérgicos no efeito anti-hiperalgésico da corrida contínua e da corrida intervalada	79

Lista de Tabelas

Tabela 1- Descrição dos experimentos nas três fases de corrida com diferentes parâmetros de treinamento.....	43
Tabela 2- Descrição dos grupos experimentais utilizados para a análise de mecanismos após 5 dias de treinamento	45
Tabela 3- Concentrações médias de lactato sanguíneo em diferentes tempos de avaliação	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1.1 Síndrome da dor regional complexa (SDCR)	14
1.1.1.1 O papel do estado isquêmico e inflamatório na SDRC-I/DPIC	17
1.1.1.2 O papel da sensibilização central induzida por estresse oxidativo e inflamação na SDRC-I/DPIC	20
1.1.2 Exercício físico e analgesia	24
1.1.3 EF e citocinas inflamatórias	31
1.1.4 EF e estresse oxidativo	32
1.1.5 EF no tratamento da SDRC-I	36
2. OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3. MÉTODOS	40
3.1 TIPO DE ESTUDO	40
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	40
3.3 ANIMAIS	41
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	42
3.5 TÉCNICAS E TESTES	46
3.5.1 Procedimentos para indução da dor pós isquemia crônica (DPIC)	46
3.5.2 Procedimentos para realização dos protocolos de corrida contínua e intervalada em esteira rolante	47
3.5.3 Testes comportamentais	48
3.5.3.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica	48
3.5.4 Análise da concentração de lactato sanguíneo em camundongos submetidos a corrida contínua e intervalada	49
3.5.5 Avaliação do mecanismo de ação do efeito anti-hiperalgésico induzido pelos protocolos de corrida contínua e intervalada	50
3.5.5.1 Dosagens das concentrações teciduais de citocinas	50
3.5.6 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo do sistema antioxidante	51
3.5.6.1 Determinação da lipoperoxidação pelo ácido tiobarbitúrico (T-BARS)	51
3.5.6.2 Determinação do dano oxidativo a proteínas (Proteína carbonilada)	51
3.5.6.3 Determinação da atividade da CAT e SOD	52
3.5.7 Avaliação do imunoconteúdo de P-ERK1/2 e P-AKT1/2/3 na medula espinal	53
3.5.7.1 Preparação das amostras	53
3.5.7.2 Eletroforese e imunodeteção	54
3.5.8 Avaliação do envolvimento dos receptores opioidérgicos sistêmicos no efeito anti-hiperalgésico induzido pela corrida	54
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO	55
3.7 ASPECTOS ÉTICOS	56
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	56
4. RESULTADOS	58
4.1 EFEITO DE DIFERENTES VELOCIDADES DA CORRIDA CONTÍNUA SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA	58
4.2 EFEITO DE DIFERENTES VOLUMES DE CORRIDA CONTÍNUA NA HIPERALGESIA MECÂNICA	60
4.3 EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA EM DIFERENTES FREQUÊNCIAS SEMANAIS SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA	62

4.4 EFEITO DO AUMENTO DA VELOCIDADE NA CORRIDA CONTÍNUA SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA.....	64
4.5 EFEITO DA CORRIDA INTERVALADA COM AUMENTO DE VELOCIDADE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA.....	66
4.6 EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO SANGUÍNEO.....	68
4.7 EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA OU INTERVALADA SOBRE A EXPRESSÃO DE ERK1/2 E AKT1/2/3.....	68
4.8 EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA OU INTERVALADA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS.....	71
4.9 EFEITO DAS CORRIDAS CONTÍNUA E INTERVALADA NO DANO OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	75
4.10 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDÉRGICOS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELAS CORRIDAS CONTÍNUA E INTERVALADA	79
5.DISSCUSSÃO	80
5.1 ANÁLISE DA INTENSIDADE DO EF	81
5.2 ANÁLISE DA DURAÇÃO DO EF	82
5.3 ANÁLISE DO EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA REGULAR POR TRÊS SEMANAS, FREQUÊNCIA SEMANAL E DO AUMENTO SEMANAL DA VELOCIDADE.....	83
5.4 ANÁLISE DO EFEITO DA CORRIDA INTERVALADA.....	85
5.5 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.....	87
5.6 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NO ESTADO REDOX NO CPF	89
5.7 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO TRONCO ENCEFÁLICO.....	91
5.8 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NO ESTADO REDOX NO TRONCO ENCEFÁLICO	92
5.9 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA MEDULA ESPINAL.....	92
5.10 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA SOBRE O ESTADO REDOX NA MEDULA ESPINAL	94
5.11 TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	95
5.12 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA SOBRE A EXPRESSÃO DE ERK1/2 E AKT1/2/3 FOSFORILADAS NA MEDULA ESPINAL	96
5.13 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDES SISTÊMICOS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA	98
6. CONCLUSÃO	100
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
REFERENCIAS.....	104
ANEXO A- Parecer Aprovação do Comissão de Ética	128

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de dor regional complexa (SDRC), a qual manifesta-se por dor neuropática na fase crônica da doença, é o nome atual de uma síndrome descrita pela primeira vez por Ambroise Paré no século XVII¹. Vários nomes têm sido usados desde então para descrevê-la: causalgia, algodistrofia, distrofia simpática reflexa, síndrome do ombro à mão, e síndrome de Sudeck². Normalmente, apenas um membro é afetado. Na ausência de lesão nervosa aparente é chamada de SDRC do tipo I³.

A incidência da SDRC-I é estimada em cada 5 -25 por 100.000 pessoas por ano, com frequência maior entre os 40-60 anos, no sexo feminino e o membro inferior é o mais afetado⁴. A síndrome pode se desenvolver em consequência de um trauma leve ou severo e estima-se que 1% de todas as fraturas evoluem para SDRC-I¹. É uma complicação comum de fraturas do rádio distal (4-37% dos casos), de cirurgia do túnel do carpo (2-4% dos casos) ou cirurgia para correção de contratura de Dupuytren⁵. No entanto, pode ocorrer após qualquer tipo de lesão, tais como uma queda ou entorse articular. Apresenta um pico de incidência de 61-70 anos devido também ao aumento do risco de fraturas em pessoas idosas⁶.

Os fatores de risco para o desenvolvimento da SDRC-I são multifatoriais e incluem idade, gênero feminino, índice de massa corporal (IMC), fraturas de alta energia e fatores relacionados ao tratamento, como o número de reduções da fratura, o tipo de cirurgia realizada e duração e qualidade da imobilização^{7,8}.

A SDRC-I geralmente é iniciada quando uma resposta inflamatória surge em decorrência a uma lesão dos tecidos profundos, que produz uma síndrome do tipo compartimental, que prejudica o fluxo sanguíneo para o músculo, para o nervo e o osso produzindo uma lesão por isquemia e reperfusão (IR).⁵ A lesão por IR é um fenômeno multifatorial caracterizado por vários mecanismos patológicos que afetam arteríolas, capilares, vênulas e a microvasculatura de ossos e nervos periféricos^{9,10,11}.

O componente inflamatório já foi demonstrado e discutido no modelo animal da SDRC-I, chamado de dor pós isquemia crônica (DPIC), sendo observado pelo aumento nas concentrações de NFκB, TNF-α, IL-1β e IL-6 no

tecido periférico apenas na fase aguda (2 e 48 h) após indução da DPIC em ratos^{12,13}. Como o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória mestra, ela desempenha papel na ativação de uma cascata inflamatória que envolve a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1 β , IL-6 e IL-8^{14,15,16}.

Esta lesão, leva a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) ou nitrogênio que prejudicam os capilares por danificarem as células endoteliais estimulando-as a liberar vários mediadores pró-inflamatórios. Muitas dessas moléculas são quimiotáticas e recrutam monócitos, leucócitos e plaquetas, que liberam TNF- α , IL-1 β e IL-6, que produzem efeitos tóxicos, que podem espalhar a lesão tecidual às regiões adjacentes¹⁷. Em consequência da produção deste estresse oxidativo e da liberação de citocinas pró-inflamatórias, descargas ectópicas nos neurônios nociceptivos são geradas, aumentando a neurotransmissão na medula espinal, induzindo um estado de sensibilização central, gerando um quadro de dor neuropática¹⁸.

Poucos tratamentos provaram ser eficazes na SDRC-I, em parte, devido a uma compreensão pobre dos mecanismos subjacentes desta condição. O tratamento continua desafiador. Diversos protocolos farmacológicos têm sido utilizados e as terapias físicas fazem parte da reabilitação do indivíduo com a SDRC-I⁴.

Muitos estudos com animais e humanos têm sido realizados utilizando o exercício físico (EF) para reduzir a dor neuropática¹⁹⁻²². No entanto, poucos estudos foram realizados verificando o efeito EF no tratamento dos sinais e sintomas da SDRC-I. Apesar das limitações, os poucos estudos realizados mostram efeitos benéficos do exercício no tratamento da SDRC-I²³.

Paralelo a este fato, dados epidemiológicos têm demonstrado que o EF reduz a incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo²⁴, isto acontece, devido a prática regular do EF, que gera um processo de desequilíbrio e recuperação entre as sessões realizadas. As adaptações induzidas pelo exercício atuam sobre os diversos sistemas corporais, incluindo o sistema antioxidante endógeno²⁵.

Além das evidências dos efeitos benéficos do EF sobre o estresse oxidativo; tem sido observado em vários modelos experimentais de dor neuropática, que o EF reduz a alodinia e hiperalgesia mecânica por meio da

inibição da ativação de células neurogлияis na medula espinal (células responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias)^{22,26}.

Há vários modelos de EF utilizados no tratamento da dor neuropática, destacam-se EF aeróbios contínuos em esteira e em meio aquático, porém, não há descrito até a presente data estudos que utilizem EF intervalados de alta intensidade para o tratamento da dor neuropática em modelo animal.

Recentemente, o HIIT (sigla em inglês para *High Intensity Interval Training* ou treinamento intervalado de alta intensidade) tem sido apontado pelo Colégio Americano de Medicina Esportiva²⁷ como exercício preferido dos norteamericanos e apresenta adaptação cardiovascular e metabólica semelhantes ao EF aeróbio contínuo²⁸. Entretanto, poucos pesquisadores investigaram os efeitos do HIIT na dor crônica^{29,30,31}.

Considerando que a base fisiopatológica da SDRC-I envolve um processo inflamatório inicial orquestrado pelo aumento de estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias locais associadas a sensibilização central na fase crônica; e tem sido demonstrado que o EF apresenta grande potencial terapêutico na redução de tais mediadores pró-inflamatórios e oxidativos, a pertinente associação da utilização do EF na redução da hiperalgesia mecânica observada na SDRC-I torna-se inevitável.

Neste sentido, o presente estudo inicialmente investigou os efeitos da corrida regular contínua e intervalada na esteira sobre a hiperalgesia mecânica em camundongos com DPIC; e secundariamente, analisou o estado redox e inflamatório, bem como o envolvimento de enzimas chave no desenvolvimento da sensibilização central e dos receptores opioides neste efeito.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Síndrome da dor regional complexa (SDRC)

A SDRC é o nome atual de uma síndrome descrita pela primeira vez por Ambroise Paré no século XVII¹. Vários nomes têm sido usados desde então para descrevê-la: causalgia, algodistrofia, distrofia simpática reflexo, síndrome do ombro à mão, e síndrome de Sudeck². Normalmente apenas um membro é afetado. Os sintomas podem aparecer na ausência de uma lesão nervosa aparente, em que a doença é denominada de SDRC - I ou após uma lesão de nervo periférico, que é então chamada de SDRC- II³².

A SDRC-I pode ser definida como uma síndrome de dor articular e periarticular associada com uma desregulação vasomotora. É caracterizada principalmente pela dor crônica, envolvimento do sistema nervoso autônomo e motor e problemas sensoriais³². Em uma definição mais recente em 2010, foi considerada com uma etiologia multifatorial, não envolvendo apenas o sistema nervoso simpático, mas o sistema somatossensorial periférico e central³³.

A incidência de SDRC-I é extremamente difícil de avaliar, em um estudo com Coreanos estimou-se que a cada 5-25 por 100.000 pessoas por ano são portadores, maior frequência na faixa etária entre 40-60 anos, sexo feminino, afetando principalmente o membro inferior. Um outro estudo com holandeses, relatou a incidência de ser 26 para cada 100.000 habitantes por ano, sendo que as mulheres são afetadas três vezes mais do que os homens^{3,6}.

A síndrome pode se desenvolver em consequência de um trauma leve ou severo e estima-se que 1% de todas as fraturas irá evoluir para SDRC-I. É uma complicação comum de fraturas do rádio distal (4-37% dos casos), em cirurgia do túnel do carpo (2-4% dos casos) ou cirurgia para correção da contração de Dupuytren. No entanto, pode ocorrer após qualquer tipo de lesão, tais como uma queda ou entorse^{34,35}.

É uma forma relativamente rara de dor crônica que envolve principalmente as extremidades. É caracterizada por dor e hipersensibilidade em queimação na extremidade envolvida, acompanhada por alterações na aparência e na temperatura da pele e no suor. A presença de alterações da função motora também é verificada com frequência^{34,35}. Também pode ser

precedida por uma lesão do nervo, por um motivo de imobilização, ou por outros traumas aparentemente menores. De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), os sintomas muitas vezes não são proporcionais ao evento inicial e sua evolução não está claramente definido ou compreendido³⁶.

O diagnóstico de SDRC-I requer uma anamnese e um exame clínico detalhados, eliminando por meio do diagnóstico diferencial diversas doenças neurológicas, vasculares, inflamatórias, musculoesquelética ou de origem psicológica. A progressão típica de SDRC-I consiste de uma fase inflamatória aguda durante os primeiros três meses; a próxima fase, entre o terceiro e sexto mês, é caracterizada por alterações tróficas; em seguida, progride para uma hipotrofia em torno do sexto mês. A duração destas fases é extremamente variável e os estágios e sintomas não acontecem necessariamente nesta sequência. Clinicamente, o SDRC-I é caracterizada como uma dor inflamatória em estágio agudo e dor neuropática no estágio crônico, com disfunção sensorial apresentando alodinia e hiperalgesia^{37,38}.

Dentre os sintomas presentes, a dor é o sintoma mais importante ao longo do desenvolvimento da SDRC-I, a magnitude do quadro algico muitas vezes é desproporcional em relação à lesão inicial e pode estender-se para áreas adjacentes à área lesada inicialmente. Os pacientes com SDRC-I frequentemente descrevem sua dor como em queimação, esmagamento ou sensação de ardor³⁹, podem ser qualificadas como hiperalgesia (sensibilidade exagerada à dor ou sensação elevada a estímulos dolorosos), ou alodinia (sensibilidade que em situações normais não provocam dor)¹. Pesquisas sobre a SDRC-I, realizadas durante a última década, aumentaram substancialmente o conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos indicando que eles são multifatoriais. Há o envolvimento do sistema nervoso e imunológico, com quadros de inflamação, alteração da função simpática e catecolaminérgica, representação somatossensorial alterada no encéfalo, fatores genéticos, interações psicofisiológicas e principalmente sensibilização periférica e central, o que explica o aparecimento da dor crônica persistente⁴⁰.

Com o objetivo de compreender os mecanismos biológicos envolvidos na SDRC, estão descritos pela literatura alguns modelos que possibilitam a mimetização da síndrome em animais. São quatro modelos animais: lesão do

nervo periférico, lesão por isquemia e reperfusão, trauma e imobilização (causas cirúrgicas e traumáticas) dos membros⁴¹⁻⁴⁴. Cada modelo apresenta características semelhantes a síndrome em humanos, porém, é importante salientar que nenhum destes modelos apresenta com exatidão o quadro apresentado em humanos⁴⁵.

Os mecanismos subjacentes à SDRC-I podem diferir entre pacientes e até no mesmo paciente ao longo do tempo, especialmente na transição da "SDRC quente" (fase aguda) para "SDRC fria" (fase crônica). O diagnóstico e a intervenção precoces são os componentes mais importantes para o tratamento desta patologia incapacitante^{40,46}.

Na fase aguda, surgem os primeiros sintomas como membro quente, eritematoso, edema e dor. Nesta fase alguns mecanismos já estão descritos como: ativação do sistema auto imune⁴⁷, ativação de queratinócitos, proliferação e expressão de mediadores inflamatórios como as citocinas, dentre elas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12) e fator de crescimento nervoso (NGF), ativação de mastócitos e liberação radicais livres^{48,49}. A substância P (SP) expressada nos tecidos periféricos do membro envolvido, está intimamente ligada a manutenção dos sinais e sintomas da SDRC-I^{50,51}.

Na fase crônica ou distrófica além da dor, estão presentes ainda pequeno edema, diminuição da temperatura e presença de subcianose. Em alguns pacientes há alterações emocionais, mudanças cognitivas e distúrbios do movimento estão presentes em decorrência da sensibilização central^{52,2}.

Em relação aos mecanismos envolvidos na SDRC-I, destacam-se, o envolvimento do sistema nervoso simpático (SNS)⁴⁵ no desenvolvimento e/ou manutenção do quadro de inflamação neurogênica com a liberação de SP e peptídeo relacionado ao gene da Calcitonina (CGRP) de neurônios aferentes⁵³. Recentemente é considerada como uma doença autoimune, já que pacientes que foram tratados com imunoglobulina intravenosa apresentaram melhora dos sintomas⁵⁴.

Já está bem estabelecido que a SDRC-I apresenta mecanismos de sensibilização central com alterações funcionais em algumas regiões do encéfalo, promovendo alterações motoras, bioquímicas e anatômicas,

reforçando a necessidade de um tratamento precoce assim como medidas de tratamento locais e sistêmicas^{55,56,57}.

O tratamento continua sendo um desafio terapêutico e portanto, diversos protocolos farmacológicos podem ser utilizados como analgésicos, opioides, antipsicóticos, antidepressivos e anti-inflamatórios. Além dos protocolos farmacológicos são descritos o bloqueio neural, estimulação da medula espinal, fisioterapia e terapias cognitivas/comportamentais servem como alternativa para a diminuição do quadro algico^{58,59,60}. Atualmente, o tratamento ideal deve ser multidisciplinar com o foco na mobilização do membro afetado. Os tratamentos mais efetivos para SDRC-I são os medicamentos prescritos para a dor neuropática¹.

Dentre os tratamentos não farmacológicos ganham destaques a massagem, a dessensibilização do membro afetado, o trabalho muscular isométrico, a liberação muscular, órteses e mobilização ativa dentro da amplitude do movimento não-doloroso, especificidades dos profissionais de fisioterapia e terapia ocupacional. Um grande ensaio randomizado mostrou que as terapias funcionais são eficazes na melhoria das condições de SDRC-I⁶¹.

1.1.1.1 O papel do estado isquêmico e inflamatório na SDRC-I/DPIC

Em humanos, geralmente a SDRC-I é iniciada quando uma resposta inflamatória a uma lesão dos tecidos profundos produz uma síndrome do tipo compartimental que prejudica o fluxo sanguíneo para o músculo, nervo e osso. No seu início, a SDRC-I é frequentemente caracterizada por edema regional significativo⁵. O edema se desenvolve devido ao aumento e acúmulo de plasma no espaço intersticial⁶². Na fase inicial da SDRC-I há extravasamento plasmático⁵, o aumento da densidade de vasos perfundidos e uma maior capacidade de filtração capilar^{63,64}. A pressão exercida pelo acúmulo intersticial de plasma extravasado dentro de um espaço anatômico relativamente pequeno, oclui os capilares dos tecidos adjacentes e provoca uma síndrome compartimental^{65,66}. Pequenas pressões dentro de um compartimento miofascial como 30-40 mmHg também obstrui o fluxo capilar^{67,68}. Os pacientes muitas vezes fazem uma SDRC-I seguida de fraturas, lesões articulares e de cirurgia de punho, cotovelo ou joelho^{69,70}.

É interessante notar que a SDRC-I quase sempre se manifesta após uma lesão de tecidos profundos (fraturas, entorses, cirurgias, lesões por esmagamento, etc.). Por outro lado, uma SDRC-I iniciada após uma lesão estritamente cutânea (por exemplo, uma laceração ou queimadura) é extremamente rara, pois o edema no espaço subcutâneo não produz uma síndrome compartimental⁷¹.

Tem sido proposto que no modelo animal de SDRC-I idealizado por Coderre⁴², uma síndrome compartimental é criada pelo período de edema extenso que se segue após a liberação do torniquete. Em seres humanos, tanto a síndrome compartimental como a SDRC-I podem ser causadas pela exposição a torniquetes excessivos^{72,73}.

No modelo os tecidos isquêmicos resultantes da lesão induzida, acumulam enzimas oxidativas, principalmente a xantina oxidase e a NADPH-oxidase. Após a reperfusão, as oxidases acumuladas reduzem o retorno de oxigênio molecular e as células que compõem os microvasos são expostas a elevados níveis de radicais livres de oxigênio, que danificam tanto o endotélio vascular quanto as células do músculo liso^{74,75}. O início da reperfusão é obviamente bem definido quando o torniquete é removido neste modelo animal, mas menos claramente demarcada quando a isquemia é devida a uma síndrome do tipo compartimental em humanos.

A lesão por isquemia e reperfusão (IR) é um fenômeno multifatorial caracterizado por vários mecanismos patológicos que afetam arteríolas, capilares e vênulas^{9,10}. Estes mecanismos interagem e geralmente contribuem para uma alça de feedback positivo que perpetua e piora a lesão por IR. Embora mais estudos foram feitos para observar a consequência da lesão isquêmica ao músculo cardíaco, fenômenos da lesão por IR também são conhecidos por ocorrerem na microcirculação do músculo esquelético^{76,77}. E ainda mais recentemente, tem sido proposto que a lesão por IR também ocorre na microvasculatura de ossos e nervos periféricos.

Como consequência do processo de lesão, as espécies reativas do oxigênio (EROs) também prejudicam os capilares por danificarem as células endoteliais estimulando-as a liberar vários mediadores pró-inflamatórios. As EROs aumentam a expressão de selectinas, moléculas de adesão intracelular e

extracelular^{78,79}, fatores complemento⁷⁹, leucotrieno B₄⁸⁰ e o fator de ativação de plaquetas⁸¹.

Muitas dessas moléculas são quimiotáticas e recrutam monócitos, leucócitos e plaquetas, que se acumulam e ocluem o lúmen dos capilares, e liberam TNF- α , IL-1 β e IL-6, que produzem efeitos tóxicos que podem espalhar a lesão tecidual às regiões adjacentes¹⁷. Esta oclusão gera um fenômeno conhecido como “*slow-flow/no-reflow*”. *Slow-flow* se refere à oclusão parcial do lúmen do vaso sanguíneo que diminui o fluxo de sangue, enquanto a oclusão completa do vaso com interrupção do fluxo é chamada de no-reflow, sendo este de acordo com os estudos, um ponto chave na SDRC-I em humanos e na dor pós-isquemia crônica” (DPIC) em animais⁸².

Uma hipótese defendida pelo grupo do pesquisador canadense Coderre é a de que o estado isquêmico e inflamatório muscular resulta na ativação do neurônio nociceptivo periférico⁸². A isquemia no músculo poderia ser a causa direta de descargas do neurônio sensibilizando-o, devido à acidose⁸³. Há muito tempo é sabido que a acidose tecidual associada com o aumento de lactato causa dor muscular em tecidos isquêmicos⁸⁴.

Além disso, foi observado em ratos com DPIC que a alodinia mecânica está diretamente correlacionada com os níveis de lactato no músculo da pata posterior submetida a IR^{12,46}. Estes resultados são consistentes com relatos de pacientes com SDRC-I de que a dor produzida por infusão de uma solução de baixo pH dentro do músculo do membro afetado, é muito mais dolorosa do que a mesma infusão no músculo contralateral⁵⁵.

Outra hipótese plausível e bastante estudada da fisiopatologia da SDRC-I, são os efeitos de um estado isquêmico e inflamatório sobre os nervos periféricos. Capilares presentes no endoneuro também estão sujeitos ao fenômeno de *slow-flow/no-reflow*. Pequenos nervos distais são especialmente vulneráveis, simplesmente porque possuem poucos capilares. Evidências do fenômeno *slow-flow/no-reflow* em microvasos do endoneuro em nervos digitais da pata posterior de ratos com DPIC, foi recentemente descrito¹⁸. Especula-se que um estado isquêmico e inflamatório dentro de um nervo periférico possa produzir descargas ectópicas espontâneas em fibras sensoriais.

Laferrière et al.¹⁸ mostrou a presença de descargas ectópicas em neurônios nociceptivos periféricos com fibras do tipo A- δ e com fibras do tipo C

em ratos com DPIC. A isquemia e inflamação no endoneuro estariam associadas com níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias que são conhecidas por produzir dor neuropática⁸⁵. A descarga ectópica nos neurônios nociceptivos devido a patologia microvascular do endoneuro causaria dor espontânea nos tecidos inervados pelos *nerve nervorum* dos próprios nervos. Neste sentido, os autores propõem que mecanismos inflamatórios e neuropáticos estão presentes na SDRC-I.

1.1.1.2 O papel da sensibilização central induzida por estresse oxidativo e inflamação na SDRC-I/DPIC

A fisiopatologia da SDRC-I ainda não está bem compreendida, mas ao longo dos anos evidências indicam o envolvimento de diferentes vias biológicas envolvidas na inflamação e no processamento central das entradas aferentes sensoriais. Ao nível dos nervos periféricos, um mecanismo em potencial é o papel de fibras do tipo A- δ e fibras do tipo C gerando uma resposta inflamatória na SDRC-I^{86,50,51}. No entanto, este mecanismo não pode explicar a ocorrência de alodinia, hiperalgesia e alterações do movimento em pacientes com SDRC-I^{87,88}.

Estas características da SDRC-I são manifestações mais prováveis de sensibilização central, um mecanismo no qual os circuitos espinais envolvidos no processamento sensorial e a integração sensório-motora tornam-se prejudicadas, apesar das entradas de aferentes estarem inalteradas⁸⁹. A sensibilização central é o fenômeno fisiológico fundamental que medeia estados de dor exagerados seguidos de lesão (trauma, lesões de plexo por tração, etc.)⁹⁰.

Recentemente, um novo modelo animal de SDRC-I, chamado de “dor pós isquemia crônica”, tem sido proposto. Neste modelo uma isquemia seguida por reperfusão, sem qualquer lesão direta do nervo, é gerada na pata posterior de ratos por meio de um torniquete transitório. Desta forma os autores demonstraram que os ratos desenvolveram sinais e sintomas da SDRC-I, ou seja, inchaço inicial, hiperemia, aumento da temperatura da pata posterior e alodinia persistente após a IR^{42,46}.

Em 2008, o mesmo grupo de pesquisa observou que os ratos com DPIC apresentam uma disfunção microvascular que produz uma isquemia muscular

persistente acompanhada pelo aumento de peroxidação lipídica (um indicador de estresse oxidativo), e dos níveis do fator nuclear kappa B (NF κ B) e de citocinas pró-inflamatórias no músculo da pata posterior com DPIC¹². Além disso, para suportar esta ideia, os autores ainda demonstraram que a alodinia pode ser reduzida por agentes que inibem o estresse oxidativo, NF κ B e a atividade das citocinas pró-inflamatórias¹².

Em condições de IR prolongada do membro posterior, foi demonstrado a geração de uma cascata bem documentada de eventos inflamatórios, com um papel importante na produção de EROs^{75,91}. Ela resulta na produção de oxidantes, superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, radicais hidroperoxila e o ânions peroxinitrito, iniciada pelas enzimas xantina oxidase^{74,92} ou NADPH-oxidase^{93,94}. A xantina-oxidase e atividade da peroxidase de lipídios estão aumentadas no nervo isquiático de ratos submetidos a constrição crônica do nervo^{95,96}.

Klafke et al. analisaram um outro componente envolvido na DPIC, a possível participação do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1, um sensor para compostos oxidantes, como o peróxido de hidrogênio) relacionado ao desenvolvimento de dor inflamatória. Eles investigaram os mecanismos envolvidos nas fases aguda (1 dia após IR) e crônica (14 dias após IR) e avaliaram o envolvimento de TRPA1, na inflamação e estresse oxidativo na dor aguda e crônica induzida por IR da pata posterior de ratos. Os autores demonstraram que os animais expostos a IR exibiram alterações fisiológicas na fase aguda (inflamatória), incluindo a infiltração de células, e produção de lactato e citocinas, aumento nos níveis de substâncias oxidativas, alodinia mecânica e ao frio⁴⁶.

Na fase crônica (neuropática), observaram aumento do estresse oxidativo (na medula espinal) e hipersensibilidade a estímulos mecânicos e frios. Finalmente, demonstraram que o bloqueio de TRPA1 reduziu marcadamente a dor aguda e crônica induzida por IR ainda foi detectado aumento dos níveis de aldeído 4-hidroxinonenal (4-HNE) (um agonista TRPA1) na pata e medula espinal após a indução da DPIC, sugerindo a possível ativação de TRPA1 durante as duas fases de SDRC-I/DPIC⁴⁶.

Em modelos de dor neuropática após uma lesão nervosa periférica, há um aumento na geração de EROs na medula espinal, enquanto há uma redução

na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)¹¹, também tem sido observado um aumento na produção de EROs mitocondrial em neurônios do corno posterior da medula espinal (CPME) no modelo de ligadura do nervo espinal⁹⁷. Estes resultados mostram a importância do papel de EROs na medula espinal, na geração e manutenção da dor crônica persistente após a lesão nervosa inflamatória ou isquêmica.

Neste sentido, tem sido sugerido que o mecanismo subjacente ao desenvolvimento da alodinia observado no modelo de DPIC, pode ser resultado do aumento de EROs na medula espinal aumentando a fosforilação do receptor N-metil D-aspartato (NMDA) induzindo a sensibilização central. Esta hipótese tem sido suportada por estudos que verificaram o nível de atividade de receptores NMDA na medula espinal e o efeito da suplementação exógena de antioxidantes em ratos com DPIC^{98,99}.

Ryu et al.⁵⁸ demonstraram a contribuição de superóxido, produzido por meio da xantina oxidase e a participação de superóxido e óxido nítrico como um precursor de peroxinitrito na sensibilização central mediada por receptores NMDA. Além disso, para fortalecer esta afirmação eles verificaram que o alopurinol (um inibidor da xantina oxidase), a SOD (enzima antioxidante) ou o L-NAME (inibidor óxido nítrico sintase) reduziram a alodinia mecânica por 4 semanas e atenuaram o aumento na medula espinal da expressão da subunidade NR1 fosforilada em ratos com DPIC.

O estudo de Park et al.⁹⁹ avaliaram se a administração intraperitoneal isolada ou conjunta das vitaminas C e E poderiam reduzir a alodinia mecânica em ratos com DPIC. Os autores também determinaram os níveis fosforilação da subunidade NR1 do receptor NMDA e de cinases reguladas por sinal extracelular (ERK) fosforilada na medula espinal. Verificaram que a administração das vitaminas antioxidantes C e E reduziu a alodinia mecânica e os níveis da subunidade NR1 fosforilada do receptor NMDA e de ERK fosforilada na medula espinal de ratos com DPIC. Além disso, a administração conjunta de ambas as vitaminas potencializou estes efeitos.

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs do inglês, *Mitogen-activated protein kinases*) são importantes para a transdução de sinal intracelular e desempenham papéis críticos na regulação da plasticidade neural e respostas inflamatórias. A família MAPK é constituída por três membros principais: a cinase

regulada por sinal extracelulares (ERK do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*), p38 e cinase c-Jun N-terminal (JNK do inglês, *c-Jun N-terminal kinase*), que representam três caminhos de sinalização separados. Evidências mostram que as três vias das MAPKs contribuem para a sensibilização da dor após lesões de tecido e de nervos por meio de mecanismos moleculares e celulares distintos¹⁰⁰. Em particular, a ativação da ERK nos neurônios do CPME pela atividade nociceptiva, desempenha um papel crítico na sensibilização central, regulando a atividade dos receptores para glutamato e canais de potássio. Após lesão nervosa, ERK é ativada nas células neurogliais na medula espinal (microglia e astrócitos), levando à síntese de mediadores pró-inflamatórios / pronociceptivos, aumentando e prolongando a dor¹⁰⁰.

Estudos recentes concentraram atenção substancial em outra via intracelular que envolve a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e a cinase Akt (PI3K/Akt)¹⁰¹. A ativação desta cascata de sinalização é iniciada por muitas citocinas e fatores de crescimento, bem como por insulina e lipossacarídeo. A Akt possui vários efetores *downstream*, incluindo a proteína de mamíferos alvo da rapamicina (mTOR, *mammalian target of rapamycin*)¹⁰² que desempenham papel como reguladores da sensibilidade do nociceptor durante a dor neuropática¹⁰³. Também está bem estabelecido que a via PI3K / Akt modula a informação nociceptiva, mediando a sensibilização central induzida por estímulos inflamatórios¹⁰⁴ e neuropáticos¹⁰⁵.

Estudos em animais e humanos têm mostrado que os estados de dor crônica podem também resultar de interações entre os sistemas imune e nervoso^{85,99,106,107}. As células neurogliais, em particular, a microglia e os astrócitos, são as células imunocompetentes do sistema nervoso central (SNC) e são ativadas após lesão ou inflamação do tecido^{108,109}.

Uma vez ativadas, as células neurogliais liberam mediadores inflamatórios e outras substâncias conhecidas por amplificar a transmissão da dor^{109,110}. A ativação de células neurogliais tem sido observada em vários modelos animais de dor crônica, incluindo a lesão do nervo espinal¹¹¹, inflamação periférica¹¹², lesão tecidual periférica¹¹³, inflamação de nervos periféricos¹¹⁴, a lesão medular¹¹⁵, e o câncer ósseo¹¹⁶.

Os astrócitos tornam-se ativados em resposta ao mesmo estímulo capaz de ativar a microglia ou por produtos liberados pela microglia ativada¹¹⁷. Tem

sido demonstrado que nas lesões nervosas, ocorre uma ativação precoce de células microgliais seguida por uma ativação tardia de células astrocitárias¹¹⁸. Além disso, vários autores têm descrito que a microglia pode ser responsável por iniciar a hipersensibilidade dolorosa induzida por lesão nervosa periférica, e os astrócitos estão envolvidos no processo de manutenção desta alteração sensorial^{119,120}.

Alguns estudos têm encontrado uma ativação do sistema imunológico relacionando-o ao trauma caracterizado por uma supra regulação de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com SDRC. Em amostras de sangue e fluído cerebrospinal de pacientes com SDRC, bradicinina¹²¹ e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IL-1 β , e IL-6) estavam aumentados¹²², ao passo que os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) estavam diminuídos.

Interessantemente, tem sido estudado o envolvimento do NF κ B na DPIC em ratos. Tem sido demonstrado que a IR da pata de ratos induz, no segundo dia, um aumento de NF κ B no músculo da pata e na medula espinal. No entanto, no sétimo dia os níveis de NF κ B musculares se normalizaram ao passo que na medula espinal ainda estava aumentado. Mediadores inflamatórios incluindo TNF- α , IL-1 β , e IL-6 tem sido encontrado na medula espinal e no fluído cérebrospinal de pacientes com SDRC-I podendo ativar ou serem ativados pelo NF κ B^{122,123,124}.

1.1.2 EF e analgesia

A atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido por músculos esqueléticos que requerem gastos de energia. Por outro lado, o EF é uma atividade planejada, estruturada, repetitiva e proposital, tendo como objetivo a melhoria ou manutenção de um ou mais componentes da aptidão física¹²⁵.

A prática do EF regular é um comportamento importante na prevenção e tratamento de uma variedade de condições, tais como diabetes tipo 2¹²⁶, hipertensão¹²⁷, certos tipos de câncer¹²⁸, como também na dor crônica¹²⁹. Em 2008, o guia americano para as atividades físicas, recomendou que os adultos devem acumular 150 minutos de exercícios aeróbios moderados ou 75 minutos

de exercícios aeróbios vigorosos por semana, ou uma combinação dos dois para benefícios à saúde¹²⁵.

Embora os benefícios do EF para a saúde sejam bem conhecidos, apenas 10% de adultos norte-americanos realizam a quantidade mínima de exercício aeróbio regularmente¹³⁰ ou exercícios de resistência muscular¹³¹. A baixa adesão é muitas vezes atribuída a questões de trabalho e do dia-a-dia, tais como a percepção de falta de tempo ou cansaço^{132,133}.

O EF é atualmente a ferramenta mais acessível e disponível e um importante adjuvante no tratamento de diversas doenças crônicas. Há na literatura diversos tipos de exercícios descritos, com diferentes prescrições e protocolos para diferentes disfunções, cabendo ao profissional escolher seus parâmetros para diferentes finalidades^{134,135,136}.

Dentre os diferentes tipos, destaca-se neste trabalho o EF aeróbio que de acordo com *American College of Sports Medicine* caracteriza-se como o EF que predominantemente usa o oxigênio no processo de geração de energia dos músculos, ou qualquer atividade que use grandes grupos musculares. Pode ser mantida continuamente e é de natureza rítmica¹²⁵.

A prática regular do EF aeróbio proporciona alterações no sistema cardiovascular, aumento da capacidade oxidativa do músculo esquelético, aumento do volume de ejeção cardíaco, maior contratilidade do miocárdio e volume diastólico final, resultando em maior débito cardíaco máximo¹³⁷.

A prescrição de EF deve ser realizada por profissional competente e em comum acordo com o praticante. De acordo com Hechanova et al.¹³⁸ são 5 áreas importantes relacionadas ao exercício: avaliação, orientação, concordância entre profissional e praticante, assistência e motivação e organização. Todos fatores importantes para a obtenção dos resultados desejados.

Dentre os diferentes objetivos da prática do EF, a periodização dos exercícios é uma estratégia organizacional importante, promove a variação sistemática na especificidade de treinamento, intensidade e volume¹³⁹.

A periodização dos EF, ainda é pouco abordada em trabalhos voltados ao alívio da dor. São várias as formas de prescrever um EF, mas em geral as variáveis como intensidade, volume e frequência de treinamento estão presentes em estudos que utilizam o exercício aeróbio como terapia. De maneira geral, os protocolos elaborados para as pesquisas com animais com hiperalgesia

apresentam poucas similaridades com os protocolos de EF em humanos além de apresentarem diferentes protocolos, modelos e conclusões de sua efetividade¹⁴⁰.

Os EF devem ser prescritos e periodizados adequadamente para que sejam evitadas lesões osteomioarticulares decorrentes da fadiga e excesso de treinamento. Para que sejam alcançados os objetivos da prática, deverão seguir estímulos progressivos de sobrecarga (volume ou intensidade), respeitando uma correta recuperação do praticante¹⁴¹. Em uma revisão recente foram avaliados trabalhos que empregaram o treinamento periodizado no tratamento da dor. Concluiu-se que o treinamento periodizado foi efetivo na redução da dor e melhora da qualidade de vida em pessoas com dor lombar¹⁴⁰.

A intensidade de um EF pode ser mensurada através de parâmetros fisiológicos como a frequência cardíaca máxima¹⁴², consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx)¹⁴³ e marcadores metabólicos como a concentração de lactato sanguíneo¹⁴⁴.

Dentre os EF aeróbios, há a modalidade de EF intervalado, onde o exercício pode ser realizado alterando a intensidade em intervalos. Esta alternância de intensidades, gera sobrecarga metabólica em diferentes tecidos corporais e dependendo do protocolo utilizado, alternar entre metabolismo aeróbio e anaeróbio (exercícios realizados sem a presença do oxigênio)¹⁴⁵.

O HIIT destaca-se como uma das mais promissoras formas de EF do século XXI de acordo com *American College Sports and Medicine*. Pode ser definido por períodos de EF intensos que podem variar de 5 segundos a 8 minutos de duração e são realizados de 80% a 95% da estimativa da frequência cardíaca máxima (FCmáx) de uma pessoa, intercalados por períodos iguais de recuperação realizados entre 40% e 50% da FCmáx. Pode ter a duração total de 20 a 60 minutos. A prescrição deste treinamento depende do objetivo e pode apresentar um baixo ou alto volume de treinamento^{146,147,148}.

Atualmente é prescrito para pessoas saudáveis, atletas de diferentes esportes e pessoas em reabilitação cardíaca, diabetes melitus, síndromes metabólicas em crianças e portadores de câncer, com efeitos satisfatórios e com baixo risco ao praticante¹⁴⁹⁻¹⁵³.

Com a preocupação de verificar a aceitação, tolerabilidade e os possíveis efeitos negativos do exercício em intervalos de intensidade aumentada sobre a

doenças, Sandstad et al. verificaram uma boa tolerabilidade do exercício em pacientes com artrite reumatoide, com melhora acentuada das condições cardiovasculares, sem aumento da dor, da atividade da doença ou no quadro inflamatório após 10 semanas de treinamento³¹. Mijwel et al., com a proposta de inserir o exercício intervalado em pacientes em tratamento quimioterápico, propuseram um protocolo intervalado por 16 semanas e concluíram que o protocolo intervalado traz benefícios para saúde e melhora na qualidade de vida destes pacientes¹⁵⁴.

Andersen et al.¹⁵⁵ realizaram em estudo no qual pacientes com distrofia muscular foram submetidos ao treinamento intervalado e contínuo como tratamento. Verificaram que não há efeitos negativos em relação ao processo degenerativo e perceberam também que há preferência em realizar o exercício intervalado¹⁵⁶.

Os efeitos benéficos do HIIT estão descritos e estão relacionados ao aumento do gasto energético, perda do peso corporal, aumento da força muscular, biogênese mitocondrial e na diminuição dos fatores de risco cardiovascular similares ao exercício contínuo¹⁵⁷.

Em uma revisão recente Green et al.¹⁵⁸ demonstraram que o exercício intervalado de alta intensidade apresentou resultados superiores ao exercício contínuo em pessoas saudáveis ou com doenças crônicas. Reforçando estes achados, Gibala et al.¹⁵⁹ descreveram que o exercício intervalado de alta intensidade com menor volume de treinamento é mais eficaz nas adaptações metabólicas musculares.

Os protocolos de exercício intervalados podem variar na duração total do exercício (minutos), na intensidade dos ciclos tanto de descanso com os de máxima intensidade (85-90% FC_{máx}- recuperação em 50% FC_{máx}) assim como na relação de tempo entre máxima velocidade e descanso ativo (30 segundos em máxima intensidade por 2 minutos de recuperação ativa^{160,161}).

De maneira geral os protocolos de exercícios intervalados apresentam alguns componentes como a série, inter-série, esforço máximo e recuperação, número, duração e intensidade, bem como modo de exercício¹⁶². Os períodos de descanso podem ser ativos (% FC_{máx}) ou passivo.

As adaptações fisiológicas¹⁴⁸ específicas induzidas por esta forma de treinamento provavelmente são determinadas por muitos fatores, incluindo o

modo e a natureza precisa do estímulo do exercício, isto é, a intensidade, duração¹⁶³, número de intervalos¹⁶² realizados, bem como a duração e os padrões de atividade durante a recuperação^{164,165}. O modelo mais comum empregado em estudos de HIIT de baixo volume tem sido o *Wingate Test*, que consiste em 30 segundos de ciclismo "máximo" em um cicloergômetro¹⁶².

Os efeitos analgésicos do EF surgem a partir da década de 1970 pelo fenômeno chamado de analgesia induzida pelo exercício (AIE), o qual se caracterizou por elevações no limiar, bem como a redução da intensidade da dor durante e após o exercício^{166,167,168}. Isto foi observado inicialmente em atletas em nível competitivo. Este fenômeno foi descrito pelo médico Black em 1979, que percebeu o aumento do limiar doloroso imediatamente após exercício de corrida por 40 minutos¹²⁹.

No entanto, poucos estudos têm investigado a influência de diferentes tipos, e principalmente protocolos de EF utilizados para reduzir a dor crônica persistente em modelos animais e em humanos¹⁶⁹. Tem sido observado, em estudos clínicos recentes que avaliaram diferentes quadros álgicos, em pacientes com lombalgia, fibromialgia e dor neuropática devido ao diabetes, que o EF proporciona reduções significativas de seus quadros álgicos^{169,170}. Dentre as práticas que se utilizam do EF como forma de tratamento e prevenção de dor pode-se destacar os mais variados tipos como caminhada, ciclismo e a corrida¹⁶⁹.

Atualmente, o EF já está bem estabelecido como elemento adjuvante no tratamento da dor, pois, promove a liberação de substâncias endógenas, gerando um quadro de analgesia temporária, causando conforto ao paciente e podendo a longo prazo, diminuir sua ingestão de medicamentos¹⁷¹. Os efeitos do EF na modulação e nos mecanismos de inibição da dor são complexos, e não são totalmente conhecidos.

Os estudos envolvendo animais indicam que há vários mecanismos, incluindo a analgesia através do sistema opioide e sistemas não-opioides, que contribuem para mudança no limiar de dor resultante do exercício¹⁷².

Um dos sistemas mais bem estudados em relação a AIE, foi o sistema opioide. Tem sido demonstrado em animais que o EF induz a liberação de peptídeos opioides em todos os sítios, sendo o principal responsável pela modulação da dor nos sítios periférico, espinal e supra-espinal¹⁷³.

Em humanos, a demonstração do envolvimento do sistema opioide na AIE é ainda pouco convincente, pois os estudos apresentam resultados controversos. Em animais, observa-se que antagonistas para receptores opioides preveniram a resposta hipoalgésica seguida de EF leve, mas não intenso^{129,174}. Estes resultados demonstram que a AIE é mediada, em parte pelo sistema opioide, mas há evidências que outros sistemas de controle endógeno da dor participem deste efeito.

O sistema canabinoide recentemente verificado, também medeia a AIE¹⁷⁵. A presença de receptores canabinoides (CB) nas áreas de processamento da dor no encéfalo e medula espinal^{176,177}, sugere que os ligantes endocanabinoides denominados de N-araquidonil etanolamina (Anadamida) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), podem contribuir para o controle da dor no sistema nervoso central por meio da ativação de receptores CB1^{178,179}. Assim, como os peptídeos opioides, os endocanabinoides apresentam-se aumentados na circulação durante o exercício, e ativando o receptor CB1 envolvidos na analgesia.

De fato, foi demonstrado que o processo de analgesia gerada pelo EF não é apenas em decorrência do sistema opioidérgico ou endocanabinoide, mas outros sistemas como o purinérgico também tem sido investigado. Martins et al. demonstraram o envolvimento do sistema adenosinérgico na redução da antialodinia mecânica induzida pelo EF de alta intensidade em um modelo animal de SDRC-I²³. Este estudo suporta o uso de EF de alta intensidade no tratamento da SDRC-I e que a analgesia produzida pelo EF envolve os metabólitos do ATP como a adenosina que ativa receptores A1^{19,23,180,181}.

Um dos fatores limitantes nos estudos envolvendo EF em adultos jovens é a diversidade de tipos de exercícios utilizados nas pesquisas, como por exemplo, os exercícios aeróbios (corrida, ciclismo), exercício de resistência (levantar pesos), e exercício isométrico (contrações musculares estáticas)^{129,174,182,183}.

Um estudo com diferentes tipos de EF (ciclismo e a corrida) analisou a influência do volume de EF na AIE. Utilizando um modelo de dor experimental, os autores verificaram que o volume de 30 minutos, mas não 10 minutos, foi capaz de produzir AIE¹⁸⁴. Isto demonstra que é necessário um tempo mínimo de EF para ocorrer a AIE. Outros autores intrigados com a melhor intensidade para

gerar os efeitos analgésicos, analisaram os efeitos da intensidade na AIE após o exercício. Os autores concluíram que uma intensidade de 60-75% do consumo máximo de oxigênio ou a 50% da FCR seria ideal para observar a AIE^{182,185}.

Em seu estudo em 2004, Hoffman et al.¹⁸⁴ testaram duas formas de prescrição de exercício que misturavam duração e intensidade do EF aeróbio de caminhada em esteira com 12 indivíduos saudáveis de ambos os sexos. A percepção da dor experimental foi avaliada pelo algômetro de pressão em 5 e 30 minutos após a sessão com os dois protocolos diferentes de exercício. Os autores observaram que intensidade e duração do EF para induzir AIE precisam ser maiores que 50% do consumo máximo de oxigênio e 10 minutos, respectivamente.

Correlações positivas têm sido observadas entre maiores intensidades de treinamentos com aumento do limiar de dor. Kodesh e Weissman-Fogel¹⁸⁶ verificaram os efeitos analgésicos do EF aeróbio intervalado de alta intensidade comparando-os com os efeitos analgésicos dos exercícios moderados contínuos. No estudo, vinte e nove homens jovens e saudáveis não treinados foram aleatoriamente designados para o exercício aeróbio contínuo (70% da FCR e intervalado (4 × 4 min a 85% da FCR e 2 min a 60% da FCR entre os ciclos) com duração total de 30 minutos. Concluiu-se que o exercício intervalado de (85% FCR) tem efeitos analgésicos sobre a percepção da dor e podem ser incluídos em programas de tratamento da dor.

O modo de execução do exercício parece promover efeitos de magnitude diferenciada, dentre os diversos tipos de exercícios. Os exercícios resistidos parecem induzir hipoalgesia apenas por poucos minutos, enquanto o exercício contínuo (aeróbio) pode induzir por até 30 minutos após o término do exercício.^{170,173}

Em todos estes trabalhos observam-se que há diversas metodologias relacionadas ao treinamento físico em exercícios aeróbios e exercícios resistidos. O treinamento físico segue regras e orientações de acordo com o objetivo que se espera e a necessidade de cada indivíduo. De uma forma geral, há um consenso de que fazer EF possibilita o aumento do limiar doloroso e que seus efeitos ainda são de curta duração. No entanto, o tipo de EF, assim como a carga, a frequência, e o volume de treinamento que potencializem a liberação

de substâncias endógenas envolvidas na analgesia, não estão ainda bem definidos.

1.1.3 EF e citocinas inflamatórias

O EF tem sido utilizado como uma abordagem efetiva na redução da dor crônica principalmente de origem neuropática^{187,188,189}.

Sabe-se também que pessoas que realizam EF regularmente apresentam melhor qualidade de vida que os sedentários. Grace et al.¹⁹⁰ demonstraram os efeitos do exercício a livre demanda em roda voluntária nas células imunes basais em ratos submetidos a lesão do nervo isquiático. Treinaram em roda voluntária previamente por 6 semanas onde foram anotadas as distâncias percorridas. Concluíram que o EF realizado preveniu a alodinia, assim como a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α) e o aumento da liberação de IL-10.

Neste sentido, Cobianchi et al.²¹ analisaram os efeitos de dois protocolos (curto e longo) de corrida na esteira na dor neuropática e ativação neuroglial (microglia e astrócito) na medula espinal, induzida pela constrição crônica do nervo isquiático. Os autores encontraram que ambos protocolos de EF foram efetivos em aliviar a alodinia mecânica. Além disso, eles demonstram que o protocolo curto também foi efetivo em reduzir ativação das células neurogliais.

Corroborando e estendendo estes achados, Kami et al.¹⁹¹ utilizando o modelo de dor neuropática induzida pela constrição parcial do nervo isquiático, também verificaram que a corrida na esteira reduz a alodinia mecânica e ativação microglial na camada superficial do CPME. No entanto, eles também verificaram um baixo número de células microgliais ativadas com o núcleo expressando H3K9 acetilada após a lesão nervosa que foi significativamente aumentada pelo EF. Recentes estudos têm mostrado que a hiperacetilação de histonas pode levar a produção de IL-10.

Bobinski et al. estudando os efeitos de um protocolo de exercício de baixa intensidade verificaram que o EF realizado na esteira também foi capaz de diminuir a alodinia mecânica causada pelo esmagamento do nervo isquiático. Os autores verificaram que esta lesão nervosa traumática aumentou os níveis de TNF- α e IL-1 β na medula espinal e que duas semanas de EF reduziu

significativamente os níveis destas citocinas pró-inflamatórias¹⁸⁷. Bobinski et al. concluíram também que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) são neutralizadas pelo EF de baixa intensidade realizadas por duas semanas em esteira no tronco encefálico de camundongos¹⁹².

Chen e colaboradores (2012) em um modelo de constrição do nervo isquiático em ratos, concluíram que os níveis de TNF- α e IL-1 β estavam diminuídos após exercícios em esteira ou natação quando comparados aos sedentários¹⁸⁸.

Neste sentido é possível perceber que modelos de neuropatias de diferentes etiologias (ligadura parcial, ligadura total e esmagamento) podem induzir alodinia mecânica acompanhada pela ativação de células neurogлияis, as quais foram verificadas diretamente pelo aumento da marcação de estruturas constituintes das células neurogлияis ativadas (GFAP ou CD11b) ou pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias. Nestes modelos o EF na esteira foi efetivo em reduzir alodinia mecânica e ativação de células neurogлияis.

Pervaiz e Hoffman-Goetz verificaram o efeito de uma sessão exaustiva de EF no hipocampo e nos linfócitos intestinais de ratos. Foram medidos os níveis de TNF- α , IL-6, and IL- β . Concluíram que os níveis estão aumentados em ambos os sítios, porém este achado não gera apoptose no hipocampo dos animais¹⁹³.

Recentemente, Bobinski et al. em um estudo com camundongos submetidos ao modelo de esmagamento do nervo isquiático, que foram submetidos ao EF de baixa intensidade em esteira por duas semanas. Concluíram que a hipoalgesia induzida pelo exercício foi mediada por IL-4 através das respostas neuro-imunes periféricas e centrais²².

1.1.4 EF e estresse oxidativo

Dentre os diferentes efeitos do EF, tem sido demonstrado que a sua prática regular pode aumentar a expectativa média de vida e também servir como um estimulante estressor. Está bem estabelecido que a geração de EROs é aumentada durante o exercício^{25,194}. No entanto, dados epidemiológicos têm demonstrado que o exercício reduz a incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo²⁴. Este fenômeno apesar de parecer, não é um paradoxo; isto é resultado da adaptação induzida pelo EF.

O processo de adaptação envolve a ativação do sistema antioxidante, sistemas de reparação/eliminação de danos oxidativos e influências sensíveis a transcrição redox, por conseguinte, a expressão gênica e a produção de proteínas. Portanto, os baixos níveis desse processo de adaptação induzida pelas EROs causada pelo EF, cria um sistema que se assemelha a hormese. A teoria da hormese afirma que os sistemas biológicos respondem de uma forma curva em sino à exposição de produtos químicos, toxinas e radiação¹⁹⁵.

Recentemente, a teoria da hormese tem sido estendida para liberação de EROs, no qual há um platô que pode ser modulado pelo EF. Assim, tem sido proposto que o EF pode modular as EROs e os efeitos podem ser descritos pela curva de hormese¹⁹⁵.

A "toxina" estimulante durante o exercício é a formação de EROs, que evoca a adaptação específica, como o aumento da atividade de enzimas de reparação de danos oxidativos e de sistemas antioxidantes, o aumento da resistência ao estresse oxidativo, e diminui os níveis de dano oxidativo. Esta adaptação específica parece ser sistêmica. O músculo esquelético, fígado e o encéfalo reagem de forma muito diferente as mudanças na oferta de oxigênio durante o exercício. No entanto, os processos adaptativos relacionados com o desafio oxidativo são muito semelhantes^{24,196}.

Há vários sistemas gerando as EROs que aumentam o fluxo de sangue para o músculo esquelético durante o EF, mantendo o fluxo de sangue para o encéfalo, e reduzindo significativamente o fornecimento de oxigênio para o fígado e rim²⁴. A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é um dos principais geradores de EROs encontrados no músculo esquelético¹⁹⁷. Como resultado de exercício intenso, a produção de EROs do complexo I e III, com piruvato/malato e substrato succinato, apresentaram aumentos de 187% e 138%, respectivamente, em comparação com o grupo de ratos não-exercitados¹⁹⁸. O complexo III tem sido sugerido por produzir superóxido no sítio citoplasmático da membrana mitocondrial, o que pode ser importante para a sinalização redox¹⁹⁹.

A maior parte dos efeitos induzidos pelo EF regular tais como: aumento da massa muscular, melhora do sistema cardiovascular, redução da incidência de doenças e infecções e outras; é devido, principalmente, às adaptações

induzidas sobre os diversos sistemas corporais, incluindo o sistema antioxidante endógeno^{25,200}.

Um dos pontos finais da curva da hormese relacionados com o exercício é a inatividade física, o que, infelizmente, está associada com a nosso moderno estilo de vida “civilizado”. Está bem documentado que a inatividade física está associada com o aumento da incidência de uma variedade de doenças e condições patológicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, atrofia muscular, doenças de Alzheimer e Parkinson e obesidade²⁰¹.

A natureza intermitente do exercício dá um papel pré-condicionante para o exercício. Depois de uma sessão de EF que produz um desafio oxidativo e metabólico, seguido por um período de repouso, o sistema permite adaptar-se aos desafios causados por este estímulo²⁵. Durante os períodos de descanso, o corpo simplesmente não armazena glicogênio no músculo esquelético, o que permitiria um melhor desempenho, mas também supra regula os sistemas de reparação de danos oxidativo e antioxidantes^{202,203}.

Sujeitos que realizam exercícios regulares, apresentam níveis mais elevados do conteúdo mitocondrial, devido a uma resposta adaptativa, e produzem níveis baixos de EROs em uma determinada intensidade de exercício do que indivíduos não treinados. Portanto, o excesso de EF, é prejudicial para os indivíduos não-treinados, mas o treinamento progressivo permite as células desintoxicarem mais facilmente de uma quantidade maior de EROs, em parte, pela indução da atividade de sistemas antioxidantes¹⁹⁶.

Há uma abundante literatura reportando a adaptação muscular antioxidante no treinamento físico crônico e várias revisões também têm abordado este tema exaustivamente^{204,205}. As conclusões gerais são que: (1) Entre enzimas antioxidantes presentes no músculo esquelético, a atividade da SOD tem consistentemente sido mostrada aumentar com o treinamento de uma forma dependente da intensidade^{206,207}. A MnSOD contendo manganês é a principal responsável pelo aumento observado na atividade da SOD, enquanto a atividade CuZnSOD (cobre-zinco) é pouco afetada^{206,207}. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) também tem sido mostrada aumentada após treinamento de resistência^{208,209}. Os efeitos do treinamento sobre a atividade da CAT têm sido inconsistentes e controverso^{204,210}. (2) Há consideráveis evidências de que a atividade antioxidante observada pela adaptação ao

treinamento é devida à expressão gênica alterada, com os níveis de RNAm e de enzimas supra reguladas; (3) A adaptação ao treinamento de enzimas antioxidantes é fortemente influenciada por uma série de fatores fisiológicos e ambientais, tais como sexo, idade, dieta e medicação; (4) Finalmente, a literatura recente indica que existe um crescente interesse em examinar o significado fisiológico e clínico da adaptação antioxidante. Atividade elevada de enzimas antioxidantes com o treinamento tem demonstrados benefícios na prevenção do estresse oxidativo em uma variedade de modelos experimentais e condições patológicas²¹¹.

As repercussões do EF no cérebro já foram demonstradas em alguns estudos, como Somani et al.²¹² verificaram as alterações nas atividades de enzimas antioxidantes e nos níveis de glutathiona (GSH) nas regiões do cérebro de ratos saudáveis após sete semanas e meia em esteira. Concluíram que o EF aumentou significativamente a atividade de SOD no tronco encefálico e no corpo estriado²¹². Tentando entender outro aspecto do exercício com a prática exaustiva, Acikgoz et al.²¹³ verificaram a peroxidação lipídica, SOD e GPx no hipocampo, no córtex pré-frontal e estriado. Concluíram que EF exaustivo não alterou logo após e por até 48 horas os níveis da peroxidação lipídica e das defesas antioxidantes durante e pós exercício.

Cechetti et al.²¹⁴ verificaram o efeito de um protocolo moderado de EF diário em esteira por duas semanas sobre o estresse oxidativo e o níveis de BDNF em hipocampo, hipocampo, córtex, estriado e cerebelo de ratos saudáveis. Concluíram que o protocolo estudado não alterou em níveis cerebrais os danos e a defesa antioxidante assim como os níveis de BDNF.

Com a tentativa de verificar as diferenças entre os efeitos agudos e crônicos do EF em diferentes intensidades em esteira, Aksu et al.²¹⁵ investigaram a peroxidação lipídica, SOD e GPx e nitrito-nitrato no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal em ratos. Concluíram que o exercício crônico e agudo em esteira em diferentes intensidades não gerou estresse oxidativo nas regiões avaliadas, exceto no hipocampo.

1.1.5 EF no tratamento da SDRC-I

Poucos estudos clínicos foram realizados verificando o efeito do EF no tratamento dos sinais e sintomas da SDRC-I até o momento. Em 1999, Sherry et al.²¹⁶ realizaram um estudo prospectivo com seguimento onde reportaram os resultados dos efeitos a curto e longo prazo de um programa intensivo de exercícios físicos em crianças com a SDRC-I. Neste estudo os pesquisadores acompanharam 103 crianças (87 meninas; média de idade de 13,0 anos) com SDRC-I. Quarenta e nove sujeitos foram acompanhados por mais de 2 anos. O programa de exercício intensivo foi composto de 4 horas diárias de exercício aeróbios e funcionais, 1-2 horas de hidroterapia e dessensibilização. A dor foi avaliada por auto-relato em uma escala de 0-10 pontos, tanto verbalmente quanto com uma escala analógica visual de 10 cm. Nos resultados verificaram que noventa e cinco crianças (92%) não apresentaram mais sintomas.

Daquelas acompanhadas por mais de 2 anos, 43 (88%) ficaram livres dos sintomas (15, ou 31%, destas pacientes tinha tido uma recorrência), 5 (10%) tornaram-se totalmente funcional, mas tinha um pouco de dor contínua, e 1 (2%) apresentou limitações funcionais. O tempo médio de recorrência foi de 2 meses; 79% das recorrências foram durante os primeiros 6 meses após o tratamento. Os autores concluíram que o programa intensivo de exercício foi eficaz no tratamento da SDRC-I²¹⁶.

Em 2015, Topcuoğlu et al. investigaram os efeitos clínicos, funcionais e psicossociais do exercício aeróbio de membros superiores comparando com a fisioterapia convencional em pacientes com a SDRC-I após acidente vascular cerebral (AVC), um estudo controlado, cego e randomizado realizado por 4 semanas²¹⁷. Os pesquisadores incluíram no estudo 40 pessoas com AVC (média de idade: 65 anos), todos diagnosticados com SDRC-I. Todos os pacientes receberam foram submetidos a um programa de fisioterapia hospitalar para reabilitação após AVC e para tratamento da SDRC-I que consistiu da aplicação de TENS, crioterapia, massagem retrógrada, banhos de contraste, além de diclofenaco e paracetamol²¹⁷.

Vinte pessoas foram também incluídas no programa de EAMS que consistiu de exercícios em um ergômetro de braço de manivela (5 W/min), 30 minutos diários, 5 dias por semana, durante 4 semanas. Nos resultados

observaram que no grupo EAMS, os pacientes relataram alívio significativo da dor (89,9%) e redução significativa dos sinais e sintomas SDRC-I²¹⁷. Os autores concluíram que exercícios para os membros superiores produziu uma excelente melhora nos sintomas e sinais de SDRC-I. E que combinado com fisioterapia convencional, os exercícios aeróbios pode ser uma excelente abordagem coadjuvante para estes pacientes.

Para o nosso conhecimento, somente um estudo foi realizado em animais verificando os efeitos do EF na alodinia mecânica na SDRC-I/DPIC. Neste estudo, utilizando um modelo animal de SDRC-I, os autores induziram alodinia mecânica em camundongos após um evento de IR. Os animais foram submetidos a natação de alta intensidade em água a 37°C do sétimo ao décimo primeiro dia. Os resultados demonstraram que a natação reduziu significativamente a alodinia mecânica tanto 30 minutos quanto 24 horas após o tratamento. Além disso, os autores mostraram o envolvimento dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico no efeito da natação neste modelo²³.

O desenvolvimento recente de um modelo animal que reproduz os sinais e sintomas da SDRC-I observados em humanos, surge agora como uma nova oportunidade de realizar estudos mais controlados e testar diferentes abordagens no tratamento, possibilitando também o estudo dos mecanismos neurobiológicos subjacentes a estes efeitos.

Neste sentido, pode-se concluir que pelos escassos estudos realizados utilizando EF no tratamento da SDRC-I pode-se determinar pouco sobre os efeitos do exercício nesta condição, pois os estudos clínicos apresentam grandes viés de pesquisa uma vez que não utilizam apenas um tipo de exercício ou somente ele como tratamento. No entanto, apesar das limitações os estudos apontam efeitos benéficos do exercício no tratamento da SDRC-I.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da corrida contínua e intervalada em esteira sobre a hiperalgesia mecânica e o seu mecanismo de ação em um modelo animal de SDRC-I.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da variação da velocidade, tempo de corrida, frequência semanal e incremento da velocidade da corrida contínua em esteira na hiperalgesia mecânica induzida pela IR da pata;

- Avaliar o efeito da variação da velocidade em intervalos, tempo de corrida, frequência semanal e aumento da velocidade da corrida intervalada em esteira na hiperalgesia mecânica induzida pela IR da pata;

- Determinar as concentrações de lactato sanguíneo de animais submetidos ao protocolo de corrida contínua versus corrida intervalada em esteira submetidos à IR da pata;

- Analisar o efeito do protocolo de corrida contínua versus corrida intervalada nos parâmetros de citocinas pró e anti-inflamatórias no córtex pré-frontal, tronco encefálico e medula espinal em animais submetidos à IR da pata;

- Verificar o efeito do protocolo de corrida contínua versus corrida intervalada nos parâmetros de danos oxidativos e defesas antioxidantes córtex pré-frontal, tronco encefálico e medula espinal em animais submetidos à IR da pata;

- Verificar o efeito de um protocolo contínuo e intervalado de corrida em esteira sobre a ativação da p-ERK1/2 e p-AKT1/2/3 na medula espinal em animais submetidos a IR da pata;

- Avaliar o envolvimento dos receptores opioidérgicos no efeito anti-hiperalgésico induzido pela corrida contínua e intervalada em animais submetidos a IR da pata.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa é um estudo não clínico *in vivo e ex vivo* envolvendo modelo animal do tipo experimental que pode ser definida como a pesquisa que utiliza a manipulação de tratamentos na tentativa de estabelecer relações de causa e efeito²¹⁸.

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Foram utilizados: tiopental (Cristália, São Paulo, Brasil), quetamina (Vetnil, São Paulo, Brasil), xilazina (Ceva, São Paulo, Brasil), Naloxona (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA), Tween®, PMSF, EDTA, Aprotinina A e cloreto de benzametônio (R&D Systems, Minneapolis, EUA), Reagente de Griess, sulfanilamida (Sigma-Aldrich, MO, USA), e H₃PO₄ (ácido fosfórico), brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma-Aldrich, MO, EUA), e tetrametilbenzidina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA), tampão fosfato de potássio, ferricianeto, NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina), rotenona, succinato de sódio, azida sódica (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA), tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), coquetel de inibidores de proteases 1% (P8340 - Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA), membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), ERK 1/2 (1:500; sc-23759-R; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), p-Akt1/2/3 (1:500; sc-7985-R; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e actina-HRP (1:35000; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-10 (IL-10) (Biolegend, San Diego, United States of America). Kit de quimiluminescência (ECL; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), peroxidase (1:5000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). Anticorpo cabra anti-rabbit-HRP Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA).

Os equipamentos (todos fabricados no Brasil, exceto quando mencionado) utilizados para as análises bioquímicas foram: Leitora automática de microplacas e tiras (modelo Perlong DNM-9602, Nanjing, China), espectrofotômetro (U-2010 Spectrophotometer, Colorado, EUA), espectrofotômetro (1103, Navarra, Espanha), peagâmetro pH Meter (TEC-2, TECNAL São Paulo), moinho para abertura de células tipo potter (MA 099, MARCONI), agitador magnético com aquecimento (752^a, FISATOM, microcentrífuga refrigerada de bancada (NT 805, NOVATECNICA, São Paulo), banho-maria (100, FANEM), banho-maria (BMTE 12 OT, DeLeo, São Paulo), fotodocumentador (ChemiDoc, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), programa Image Lab (versão 4.1; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), YSL 2700 (YSL 2700, Yellow Springs, CA, EUA).

Para os procedimentos de isquemia e reperfusão e avaliação da hiperalgesia mecânica: Monofilamento de *von Frey* (0,6 g) (VFH, Stoelting, IL, EUA), balança de alta precisão (Shimadzu Corporation, Japão), Anéis elásticos (Elástico Ligadura 000-1237 Uniden, São Paulo, Brasil).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 330 camundongos *Swiss* machos (homogeneamente distribuídos entre os grupos), obtidos no biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, pesando entre 40 a 50 gramas. Os animais foram aclimatados a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ em um ciclo claro/escuro de 12 h (claro a partir das 7h:00), com acesso a ração e água *ad libitum* (Nuvilab[®]). Os animais foram aclimatados no laboratório ao menos por 1 h antes de quaisquer avaliações e experimentos e usados somente uma vez em cada experimento. Todos os experimentos comportamentais e dissecação de estruturas foram realizadas no Laboratório de Neurociência Experimental (LANEX) – Campus Universitário da Pedra Branca na Universidade do Sul de Santa Catarina. Os animais quando submetidos aos procedimentos experimentais, apresentavam entre 60 a 70 dias de nascimento e no mínimo duas semanas de ambientação no laboratório.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Todos os grupos de animais exercitados iniciaram a corrida no 7º dia após o procedimento de IR da pata. O desencadeamento dos experimentos descritos abaixo, foram realizados de acordo com a melhor resposta anti-hiperalgésica verificada nas avaliações comportamentais no teste de *von Frey* após a corrida quando comparado ao grupo não exercitado.

Este estudo foi constituído por três fases. Na primeira fase com o objetivo de investigar os efeitos da velocidade e duração da corrida contínua, diferentes grupos de animais com IR da pata foram submetidos à dois protocolos de corrida contínua (10, 13, 16 e 19 m/min) em que no primeiro protocolo os animais correram em diferentes velocidades e no segundo protocolo com variação da duração da corrida (15, 30, 60 minutos) (figura 1, fase 1).

Na segunda fase, após a definição do protocolo com os melhores parâmetros da corrida contínua que produziram maior efeito anti-hiperalgésico foi avaliado o efeito da frequência semanal (3 e 5 vezes). Ainda na segunda fase, após a definição da melhor velocidade, duração e frequência semanal, foi então testado o efeito do aumento da velocidade (19 e 21 m/min) sobre o efeito anti-hiperalgésico induzido pela corrida. E por fim, ainda na segunda fase, testou-se o efeito de um protocolo de corrida intervalada (16:19 m/min por 30 minutos) e da frequência semanal sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela IR da pata. Na terceira fase, se voltou para o estudo do mecanismo de ação sempre comparando os protocolos de corrida contínua e intervalada, por limitações do modelo de dor, se optou em realizar as análises bioquímicas e moleculares no décimo primeiro dia, assim a partir do sétimo dia após IR da pata os animais foram submetidos a cinco dias consecutivos de corrida e então eutanasiados para retirada das amostras de tecido (figura 1-2).

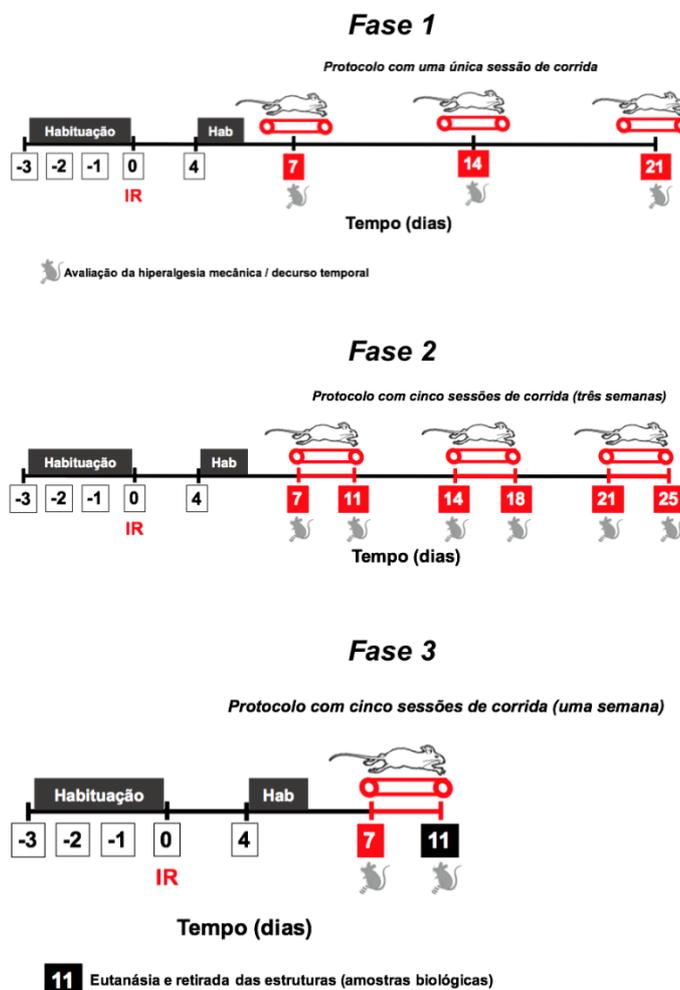


Figura 1: Representação esquemática das três fases do estudo.

Na tabela 1 abaixo são demonstrados os grupos de animais ($n = 8$) utilizados para determinar o melhor protocolo de corrida contínua e intervalada

Tabela 1: Descrição dos experimentos nas três fases de corrida com diferentes parâmetros de treinamento.

Experimento 1 – determinação da melhor intensidade da corrida	
Grupo 1: Não Exer	animais com IR da pata e que não correram
*Grupo 2: 10 m/min	animais com IR da pata e que correram à 10 m/min
*Grupo 3: 13 m/min	animais com IR da pata e que correram à 13 m/min
*Grupo 4: 16 m/min	animais com IR da pata e que correram à 16 m/min
*Grupo 5: 19 m/min	animais com IR da pata e que correram à 19 m/min

*animais correram 1 dia por semana por 3 semanas.

Experimento 2 – determinação da melhor duração da corrida	
*Grupo 1: Não Exer	animais com IR da pata e que não correram
*Grupo 2: 15 min	animais com IR da pata e que correram por 15 min
*Grupo 3: 30 min	animais com IR da pata e que correram por 30 min
*Grupo 4: 60 min	animais com IR da pata e que correram por 60 min

*animais correram à 16 m/min, 1 dia por semana por 3 semanas.

Experimento 3 – determinação da melhor frequência semanal de corrida	
Grupo 1: Não Exer	animais com IR da pata e que não correram
*Grupo 2: 3 vezes	animais com IR da pata e que correram 3 vezes
*Grupo 3: 5 vezes	animais com IR da pata e que correram 5 vezes

*animais correram à 16 m/min por 30 min, durante 5 dias por semana por 3 semanas.

Experimento 4 – Efeito do aumento da velocidade no protocolo de corrida contínua	
Grupo 1: Não Exer	animais com IR da pata e que não correram
*Grupo 2: 3 vezes	animais com IR da pata e que correram por 30 min
*Grupo 3: 5 vezes	animais com IR da pata e que correram por 30 min

*animais correram à 16, 19 e 21 m/min, na 1^o, 2^o e 3^o semana, respectivamente

Experimento 5 – Efeito do aumento da velocidade no protocolo de corrida contínua e intervalada	
Grupo 1: Não Exer	animais com IR da pata e que não correram
*Grupo 2: Contínua	animais com IR da pata e que correram por 30 min
**Grupo 3: Intervalada	animais com IR da pata e que correram por 30 min

*animais correram à 16, 19 e 21 m/min, na 1^o, 2^o e 3^o semana, respectivamente.

**animais correram à 16:19, 19:21 e 21:23 m/min, na 1^o, 2^o e 3^o semana, respectivamente.

Na tabela 2 abaixo são demonstrados os grupos de animais (n = 8) utilizados nas análises *ex vivo* que fizeram parte do estudo do mecanismo de ação dos protocolos de corrida contínua e intervalada.

Tabela 2: Descrição dos grupos experimentais utilizados para a análise de mecanismos após 5 dias de treinamento.

Grupos experimentais utilizados nas análises *ex vivo* – Fase 3

Grupo 1: Naive	animais sem IR da pata e que não correram
Grupo 2: Não Exer	animais com IR da pata e que não correram
*Grupo 3: Contínua	animais com IR da pata e que correram por 30 min
**Grupo 4: Intervalada	animais com IR da pata e que correram por 30 min

** animais correram a 16: 19 m/min por 5 dias (7^o ao 11^o dia após IR).

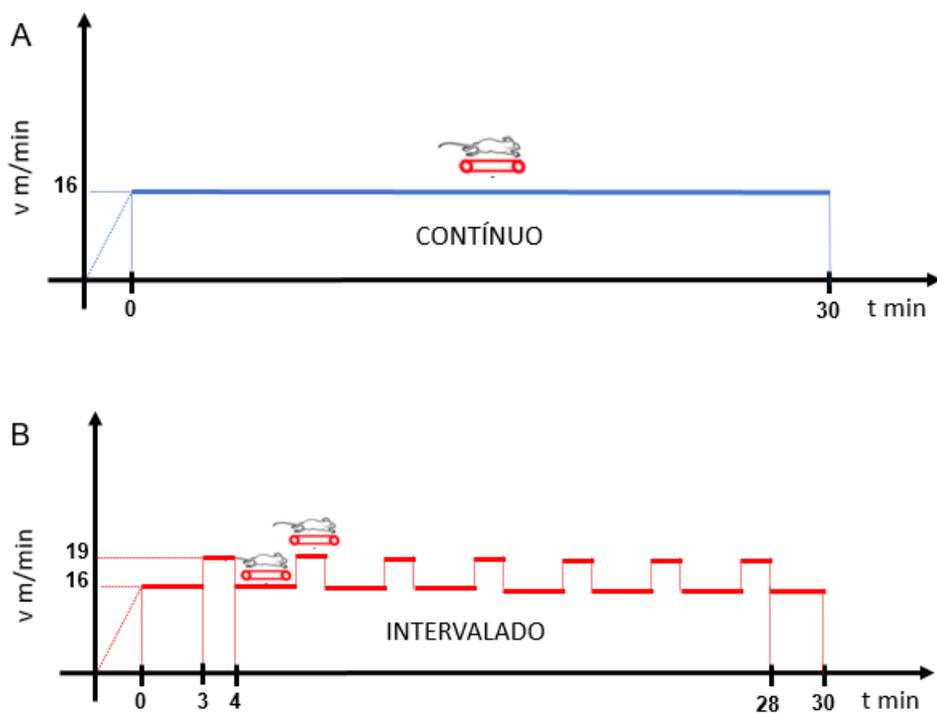


Figura 2: Representação gráfica dos tipos de corrida selecionadas na fase 3. A) Corrida contínua; B) Corrida intervalada. Min: minutos; m: metros; t: tempo; v m/min: velocidade por minuto.

3.5 TÉCNICAS E TESTES

3.5.1 Procedimentos para indução da dor pós isquemia crônica (DPIC)

O modelo animal da SDRC-I foi produzido pela exposição prolongada da pata do animal a Isquemia e Reperusão (IR) gerando um quadro de DPIC. O modelo de DPIC foi realizado conforme descrito inicialmente para ratos⁴² e adaptado para camundongos²¹⁹. Para isto os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de tiopental (80 mg/kg i.p.)²²⁰ e um anel elástico com 1,2 mm de diâmetro interno foi colocado proximal a articulação do tornozelo da pata posterior direita, reduzindo o seu fluxo sanguíneo por três horas. A seguir, o anel foi removido permitindo a reperusão (figura 3). Dois dias após a reperusão, o animal apresenta dor inflamatória e, no sétimo dia, inicia-se a dor neuropática^{42,220,221}. Durante todo o tempo em que o animal esteve com o anel elástico, ele permaneceu anestesiado e aqueles que retornaram ao estado de consciência antes das três horas necessárias, foram administrados reforços anestésicos com tiopental (20%, do volume inicial de 80 mg/kg i.p.). Para cada grupo de 8-10 animais necessários para os experimentos, foram induzidos 15 animais com uma perda total de 30% decorrente do processo anestésico ou em virtude da baixa frequência de resposta na avaliação da nocicepção mecânica (hiperalgesia mecânica).



Figura 3: Representação dos procedimentos de isquemia e reperusão da pata direita posterior: após a colocação do anel de contenção proximal ao tornozelo, nota-se a presença da isquemia sanguínea (painel A); (painel B); logo após a retirada do anel de contenção com a presença de reperusão sanguínea.

3.5.2 Procedimentos para realização dos protocolos de corrida contínua e intervalada em esteira rolante

Todos os animais foram habituados na esteira rolante durante 3 dias antes da IR da pata e quatro dias depois do procedimento de indução (figura 1), 5 minutos por dia, a uma velocidade de 5 m/min sem inclinação, no período vespertino, com o objetivo de diminuir o estresse nos animais¹⁸⁷. Os treinamentos de corrida foram realizados em esteira ergométrica (*Embreex*[®], modelo 550, São Paulo, Brasil, fig. 4A) adaptada para camundongos, com 16 raias individuais (25 x 10 x 9,5 cm) de acrílico (figura 4B).

Os diferentes programas de exercícios foram realizados por 1 (um), 3 (três dias alternados) ou 5 (cinco) dias consecutivos com 2 dias de intervalo (sábado e domingo) no período vespertino das 13h:00 as 15h:00 sempre iniciando no 7º dia após IR. Foram excluídos do estudo os animais que não conseguiram se manter na velocidade e/ou tempo estipulado no experimento. Em virtude disso, cada grupo exercitado iniciou os experimentos em esteira com 10 animais, e aqueles que conseguiram realizar o treinamento com qualidade foram selecionados para as avaliações comportamentais. Em média houve uma perda de 2 animais por grupo de experimentos, ou seja, 2 animais não conseguem prosseguir com o protocolo de corrida em esteira.

As sessões de treinamento contínuo foram realizadas colocando os animais na esteira em raias individuais e deixando eles correrem ininterruptamente até o final do tempo determinado em cada programa de corrida. Nas sessões de corrida intervalada, os animais foram submetidos a sessões de 30 minutos onde correram 3 (três) minutos em uma determinada intensidade e 1 (um) minuto em uma intensidade maior, realizando assim uma corrida de razão 3:1. Todos os animais exercitados realizaram um breve aquecimento em velocidade baixa (8 m/min) por até 1 minuto antes do treinamento propriamente dito.

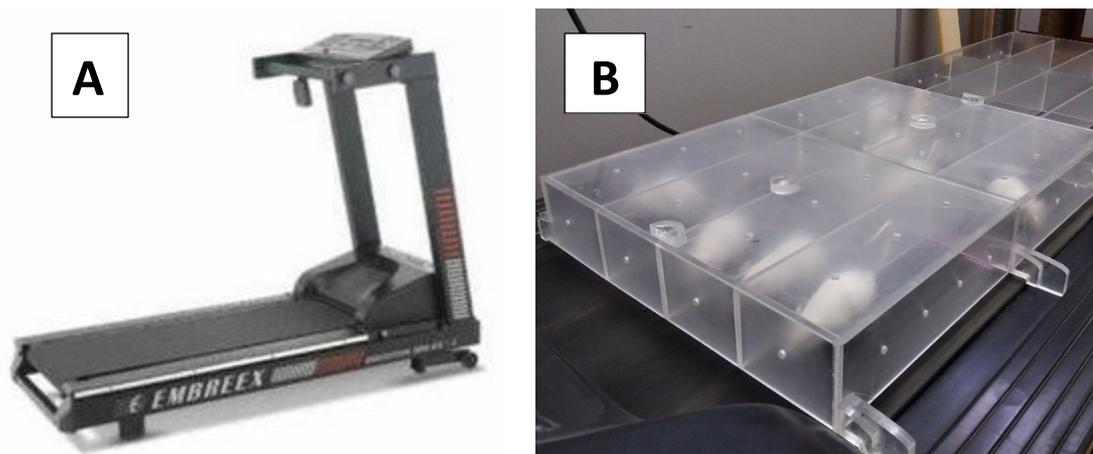


Figura 4: Representação do ambiente de treinamento da corrida. A) Esteira rolante da marca Embreex, modelo 550; B) Acrílico com 16 raias individuais colocado sobre a esteira para treinamento.

3.5.3 Testes comportamentais

3.5.3.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de *von Frey* (vF) como previamente descrito²²⁰. Os valores percentuais referentes à frequência de retirada da pata, frente a 10 estimulações da pata posterior direita com o monofilamento de *von Frey* (0,6 g) (VFH), foram considerados como indicativo de hiperalgesia mecânica. No dia anterior a indução da IR da pata, os animais foram submetidos ao teste de vF para caracterização da resposta basal. Apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta até 20% foram selecionados. Na avaliação realizada no 7º dia após IR foram selecionados somente os animais que apresentarem frequência de resposta superior a 60%. O teste foi aplicado utilizando uma plataforma de (70 x 40 cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior direita, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma²²⁰.

O filamento foi aplicado na pata posterior direita, atendendo alguns critérios como aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar (figura 5A-

B), com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio. Os dias das avaliações da hiperalgesia mecânica estão ilustrados na figura 1.

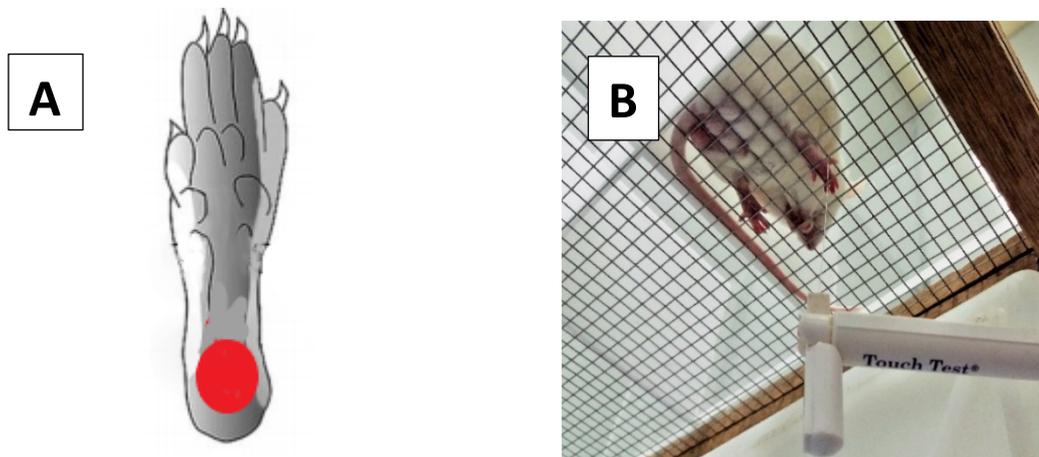


Figura 5: Representação da avaliação da hiperalgesia mecânica por meio do filamento de *von Frey*. Local da pata direita no qual é aplicado o filamento 0,6 g da fásia plantar do animal (painel A). Representação do local da ambientação para a avaliação da hiperalgesia mecânica e a aplicação do monofilamento de *von Frey*.

3.5.4 Análise da concentração de lactato sanguíneo em camundongos submetidos a corrida contínua e intervalada

Neste experimento, no 7º dia após IR da pata os animais foram submetidos aos protocolos de corrida contínua e intervalada por 5 dias consecutivos. Para avaliação das concentrações de lactato sanguíneo produzido pelos protocolos de corrida contínua e intervalada foram coletados 25 µL de sangue, aos 30 minutos de corrida, através de um pequeno corte na porção distal da cauda do animal por punção via capilar heparinizado. O sangue foi colocado em tubos ependorfe com 50 µL de fluoreto de sódio 1%, homogeneizado e o lactato foi mensurado por um método eletroquímico em analisador específico (YSL 2700). Neste experimento foram utilizados três grupos de animais: A) IR + Não Exer; B) IR + Contínuo; C) IR + Intervalado. As coletas sanguíneas foram realizadas antes da 1ª sessão de corrida, após a 1ª sessão de corrida, após a 5ª sessão de corrida. O grupo IR + Não Exer foi submetido ao protocolo de corrida intervalada apenas nos dias de coleta.

3.5.5 Avaliação do mecanismo de ação do efeito anti-hiperalgésico induzido pelos protocolos de corrida contínua e intervalada

3.5.5.1 Dosagens das concentrações teciduais de citocinas

A mensuração das concentrações teciduais de citocinas foi realizada no Laboratório de neurociências experimental LANEX-UNISUL. A coleta das amostras biológicas foram realizadas após 30 minutos da última sessão de corrida em todos os grupos. O grupo que não realizou exercício foi separado do biotério e colocado na antessala e aguardado os 30 minutos para a MIA. Amostras de tecidos do córtex pré-frontal (CPF), tronco encefálico e medula espinal de todos os grupos foram armazenadas no freezer -80°C em ependorfes.

Foram homogeneizados em solução de PBS (tampão fosfato-salino) contendo Tween 20 (0,05%), Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) 0,1 mM, EDTA 10 mM, aprotinina 2 ng/ml e cloreto de benzetônio 0,1 mM. Os homogenatos foram transferidos para tubos ependorfes de 1,5 ml, centrifugados a 6900 RPM a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi estocado a -80°C para análises posteriores.

O conteúdo total de proteína foi mensurado no sobrenadante pelo método ELISA Sanduíche. Alíquotas de 100 µl das amostras foram utilizadas para mensurar os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-10 (IL-10) de acordo com as instruções do fabricante (Biolegend). A leitura da absorvância foi realizada no leitor de placas ELISA utilizando-se os filtros de 450 nm e corrigidas a 546 nm para imperfeições na placa. O filtro utilizado para a leitura da proteína total de 630 nm

Todos os Kits para medição de citocina para camundongos (Biolegend, USA) apresentam sensibilidade de detecção de acordo com o fabricante: TNF-alpha (número catálogo 430903) - sensibilidade de detecção 7,8 - 500 pg/mL, IL-10 (número catálogo 431413) - sensibilidade de detecção 31,3 - 2000 pg/mL., IL-6 (número catálogo 431303) - sensibilidade de detecção 7,8 - 500 pg/mL., IL-1beta (número catálogo 432603 -) - sensibilidade de detecção 31,3 - 2000 pg/mL.

3.5.6 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e do sistema antioxidante

As análises de dano oxidativo e do sistema antioxidante foram realizadas no Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos - NEUROIMet localizado na UNISUL Campus Tubarão-SC, pelo grupo da professora Dra. Fabricia Petronilho. Lipoperoxidação por TBARS, proteínas carboniladas, atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram mensuradas em amostras de tecido do córtex pré-frontal, tronco encefálico e medula espinal.

3.5.6.1 Determinação da lipoperoxidação pelo ácido tiobarbitúrico (T-BARS)

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em duplicata, utilizando amostras de tecido dos animais, pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o T-BARS, destacando-se o malondialdeído, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa. Foram misturados em tubos de ensaio: amostras (100 µl), ácido tricloroacético (TCA) (12%), tampão Tris-HCl (60 mM) e ácido tiobarbitúrico (0,73%). Após a pipetagem os tubos foram fervidos por 1 hora em banho fervente, e em seguida resfriados por 15 minutos em geladeira. As amostras foram centrifugadas e com o sobrenadante foram feitas as leituras em 535 nm. A concentração de T-BARS (nmol/g) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156 mM conforme a fórmula: $[T-BARS] = [Amostra (A532 - A600) - Branco (A532 - A600)] \times 1000 \times diluições/156$.

3.5.6.2 Determinação do dano oxidativo a proteínas (Proteína carbonilada)

O dano oxidativo as proteínas por carbonilação foi determinado de acordo com o método proposto por Levine e Stadtman²²¹. As amostras de tecido foram homogeneizadas em 5% de ácido sulfossalicílico gelado e então centrifugadas a 15000 g por 5 min. Os sobrenadantes foram retirados e adicionado aos precipitados 0,5 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM em 2 M de HCl). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 1 hora, sendo

vigorosamente agitadas a cada 15 min. Então, foram adicionados 500 µl de TCA 20% e os tubos foram agitados e centrifugados por 6 min a 15000 g. Os sobrenadantes foram descartados e o excesso de DNPH foi removido lavando-se os precipitados por 3 vezes com uma solução de etanol: acetato de etila (1:1), e em seguida agitando-se os tubos e centrifugando por 3 min a 15000 g. Os precipitados resultantes foram dissolvidos em 1,0 ml de cloreto de guanidina 6 M, submetidos à agitação e incubados por 15 min a 37°C para dissolução. As absorvâncias máximas no intervalo de 360 – 370 nm foram determinadas e os valores finais das proteínas carboniladas foram determinadas utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 mM. Os brancos foram preparados substituindo-se a DNPH por HCl 2M.

3.5.6.3 Determinação da atividade da CAT e SOD

Para determinar a atividade da CAT, as amostras de tecidos foram sonicadas em tampão fosfato 50 mM e a suspensão resultante foi centrifugada a 3000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem de enzimas. A atividade da CAT foi medida pela taxa de decréscimo de peróxido de hidrogênio (10 mM) absorvância a 240 nm²²².

A atividade da SOD foi determinada medindo-se a inibição da absorção de auto-oxidação da adrenalina em 480 nm, de acordo com o método de Misra e Fridovich²²³, modificado por Boveris e Cadenas²²⁴, mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0), que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo. Quando a amostra foi colocada na cubeta a enzima (SOD) presente nesta alíquota retardava sua formação. Numa cubeta contendo 1,95 ml de tampão glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50 µl de adrenalina 60 mM (mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar para evitar a oxidação).

A velocidade inicial de formação do adenocromo foi monitorada durante cerca de 100 segundos do início da reação, com acréscimo de absorvância a cada intervalo de 15 segundos em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar diferentes alíquotas da amostra, geralmente em torno de 50 a 100 µl, dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas de 4 ou 5 pontos

permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD, medidas em duplicata.

Os valores, obtidos em duplicata, da SOD (U SOD ml⁻¹) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo. As amostras foram tratadas por uma mistura de clorofórmio: etanol (3:5 v:v), e em seguida por adição de água destilada; após as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas (5000 g durante 4 min) para retirar a hemoglobina presente nos lisados e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio²²³.

3.5.7 Avaliação do imunoconteúdo de P-ERK1/2 e P-AKT1/2/3 na medula espinal

3.5.7.1 Preparação das amostras

Amostras de medula espinal dos grupos estudados (região lombar de L2-L4) foram obtidas e armazenadas a -80 °C até sua utilização. Os tecidos congelados foram homogeneizados manualmente (com auxílio de micropistilos) em tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% e, em seguida, incubados em gelo por 30 minutos. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante (correspondente ao extrato total) foi coletado, sendo uma alíquota separada para a dosagem de proteína em cada amostra, a qual foi determinada através do método de Bradford²²⁵. Ao restante do sobrenadante, foi adicionado o tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%) na proporção de 1:6. As amostras foram fervidas (95 °C; 5 min) e permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

3.5.7.2 Eletroforese e imunodeteccção

Para a realização dos ensaios de imunodetecco, todas as amostras foram mantidas em gelo até o completo descongelamento. Após, quantidades iguais de proteínas para cada amostra (50 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (10%). A etapa de transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de PVDF foi realizada sob as seguintes condições: 90 V e 30 mA por 1 h e 30 min. Em seguida, as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau 0,2%, cido tricloroacético 3%) para visualizao das proteínas. Após lavagens em TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, Tween-20 0,05%), para a retirada do excesso do corante, as membranas foram imersas em soluço de TBS-T contendo BSA 5%, por 1 h a temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas. Na sequência, as membranas foram incubadas durante 14-16 h (2-8 °C), sob agitao, com os anticorpos primários, diluídos em TBS-T contendo BSA 1%, contra as proteínas de interesse: p-ERK 1/2 (1:500; sc-23759-R), p-Akt1/2/3 (1:500; sc-7985-R) e actina-HRP (1:35000). Ao término do período de incubao, as membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T, e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:5000, cabra anti-*rabbit*-HRP (exceto para anti-actina-HRP) por 1 h em temperatura ambiente. Após esse período, uma nova lavagem de 30 minutos com TBS-T foi então realizada seguida pela exposio das membranas durante 1 minuto e revelao através de um fotodocumentador (ChemiDoc). As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa *Image Lab* (versão 4.1). Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a β-actina, e expressos graficamente como unidades arbitrárias.

3.5.8 Avaliao do envolvimento dos receptores opioidérgicos sistmicos no efeito anti-hiperalgésico induzido pela corrida

Para avaliar a participao dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico induzido pela corrida, os camundongos com IR da pata foram submetidos  injeo intraperitoneal (i.p.) de naloxona (um antagonista não

seletivo para receptores opioides, nas doses de 1 e 10 mg/kg) ou salina (0,9%). Após 20 minutos diferentes grupos de animais foram submetidos a corrida contínua ou intervalada. Trinta minutos após, foi avaliada a hiperalgesia mecânica por meio do teste de von Frey¹⁷⁶.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1: Descrição das variáveis do estudo.

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Modelo de IR-DPIC	Independente	Qualitativa nominal	Sim ou não
Velocidade (Intensidade da corrida)	Independente	Quantitativa contínua	10, 13, 16 e 19 m/min
Duração (volume da corrida)	Independente	Quantitativa contínua	30, 45 e 60 minutos
Frequência (de corrida)	Independente	Quantitativa contínua	3 ou 5 vezes por semana
Aumento da velocidade	Independente	Quantitativa contínua de razão	2 m/min
Hiperalgesia mecânica	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Frequência de retirada da pata Média \pm erro padrão da média
Concentração de lactato sanguíneo	Dependente	Quantitativa contínua de razão	m/mol Média \pm erro padrão da média
Expressão de ERK1/2 e AKT1/2/3	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Unidades arbitrárias Média \pm erro padrão da média
Concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	pg/mg de proteína Média \pm erro padrão da média
Concentrações de Malondealdeídos e proteínas carboniladas)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	nmol/mg de proteína Média \pm erro padrão da média
Atividade das enzimas SOD e CAT	Dependente	Quantitativa contínua de razão	U/mg de proteína Média \pm erro padrão da amostra

Envolvimento dos receptores opiodérgicos	Dependente	Qualitativa nominal	Sim ou não
--	------------	---------------------	------------

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL sob o protocolo 15.045.2.07. IV (Anexo A). Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes¹⁸⁵, assim como os aspectos éticos da Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA, 201391¹⁸⁶. Esta Diretriz, assim como a legislação brasileira, estabelece a responsabilidade primária em determinar se a utilização de animais é devidamente justificada e garante a adesão aos princípios de substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*).

Antes do processo da IR todos os animais foram submetidos a avaliações basais de hiperalgesia mecânica e aqueles que apresentaram resposta acima de 40% foram retirados do estudo. Os animais que apresentaram alterações como edema persistente e a autofagia dos dedos da pata traseira foram retirados do estudo. Em média 10% dos animais que sofreram IR.

A eutanásia dos animais foi realizada por meio de uma injeção intraperitoneal de uma dose excessiva de anestésico de acordo com a resolução 1000, 12/05/2002 - Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) sob supervisão de médico veterinário responsável. A dose é uma mistura xilazina (10 mg/kg) e quetamina (80 mg/kg) em cada animal é injetado 0,7 ml. O médico veterinário Sandro Melin Sgrott (matrícula 7517) e CRMV 03844-SC foi o responsável pelo procedimento de Morte Indolor Assistida/Eutanásia (MIA).

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados no programa *Graph Pad Prism* versão 6.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Foi avaliada a distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro – Wilk. Desta forma, os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados paramétricos foram

comparados usando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de Student Newman-Keuls ou Bonferroni. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DE DIFERENTES VELOCIDADES DA CORRIDA CONTÍNUA SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados apresentados na figura 6 demonstraram que o procedimento de IR, um modelo animal de DPIC induziu hiperalgisia mecânica na pata ipsilateral dos camundongos. A hiperalgisia mecânica persistiu ao longo de todo o período avaliado por até 21 após a IR (fig. 6A-C).

No 7º dia após a IR (fig. 6A), observou-se que o grupo 16 m/min apresentou redução significativa ($p < 0,001$) comparado ao grupo Não Exer na frequência média de retirada da pata frente ao estímulo mecânico (hiperalgisia mecânica) por até 1 h após o término da corrida, com inibição máxima (IM) de $62,0 \pm 14\%$, 0,5 h após corrida. Os grupos 19 m/min e o grupo 13 m/min apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) da hiperalgisia mecânica comparado ao Não Exer em 0,5 h após o término da corrida, com IM de $45,0 \pm 10\%$ e $51,0 \pm 9\%$, respectivamente.

No 14º dia após a IR (fig. 6B) observou-se que os grupos 16 m/min e 19 m/min apresentaram reduções significativas ($p < 0,01$) na hiperalgisia mecânica em 0,5 h (IM: $46,0 \pm 15\%$) e 1 h (IM: $53,0 \pm 19\%$) após as corridas, respectivamente. O grupo 13 m/min apresentou redução da hiperalgisia mecânica ($p < 0,01$) com IM de $41,0 \pm 11\%$, também 0,5 h após o término da corrida. No grupo 10 m/min não houve diferença significativa da hiperalgisia mecânica quando comparado com o grupo Não Exer (controle) (fig. 6B).

Conforme ilustrado na fig. 6C, no 21º dia após a IR da pata se observou que os grupos 10 m/min e 19 m/min reduziram significativamente ($p < 0,001$) quando comparado ao Não Exer a hiperalgisia mecânica em 0,5 h após o término das corridas com IM de $48,0 \pm 16\%$ e $52,0 \pm 3\%$, respectivamente. No entanto, o grupo 16 m/min reduziu significativamente ($p < 0,001$) a hiperalgisia mecânica após 1 h (IM: $57,0 \pm 6\%$) após a corrida. No grupo 13 m/min não se notou diferença na hiperalgisia mecânica quando comparado ao Não Exer.

○ Não Exer ● 10 m/min ● 13 m/min ● 16 m/min ● 19 m/min

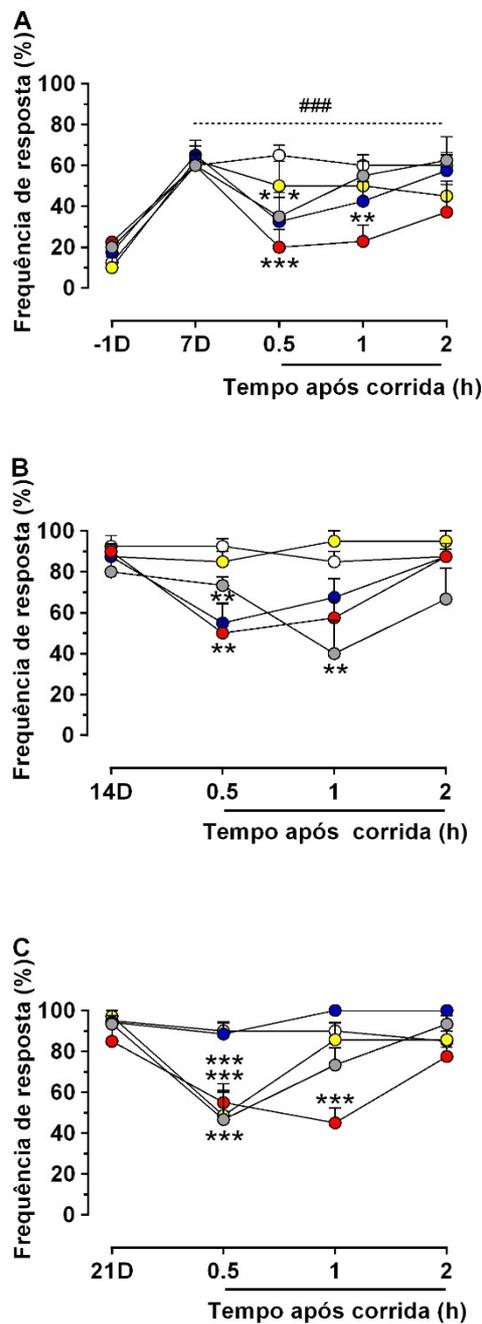


Figura 6: Efeito de diferentes velocidades da corrida contínua na hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR da pata. Sétimo (7^o, painel A), décimo quarto (14^o, painel B) e vigésimo primeiro (21^o, painel C) dia após IR da pata. Os valores representam a média \pm EPM ($n = 8$ animais). ### $p < 0,001$ quando comparados com o tempo pré (-1d) IR da pata, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo Não Exer (controle). Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Grupo Não Exer: grupo que não realizou exercício, grupo 10 m/min: grupo que realizou exercício por 30 minutos na velocidade de 10 m/min, grupo 13 m/min: grupo que realizou exercício por 30 minutos na velocidade de 13 m/min, grupo 16 m/min: grupo que realizou exercício por 30 minutos na velocidade de 16 m/min; grupo 19 m/min: grupo que realizou exercício por 30 minutos na velocidade de 19 m/min. D: dia; h: hora (s); m/min: metros por minuto. IR: isquemia e reperfusão.

4.2 EFEITO DE DIFERENTES VOLUMES DE CORRIDA CONTÍNUA NA HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados da figura 7 demonstram que diferentes volumes de corrida (15, 30 e 60 minutos) reduziram a hiperalgesia mecânica em diferentes tempos após o procedimento de IR (fig. 7A-C). No 7º dia após a IR da pata (fig. 7A), observou-se que os grupos 30 minutos e 60 minutos apresentaram diminuição significativa ($p < 0,001$) da hiperalgesia mecânica com IM de $79,0 \pm 5\%$ e $59,0 \pm 12\%$ nos respectivos grupos, 1 h após o término da corrida quando comparado ao grupo Não Exer (controle). O grupo 15 minutos apresentou redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,01$) com IM de $35,0 \pm 10\%$, também 0,5 h após o término da corrida.

No 14º dia após a IR (fig. 7B) verificou-se uma redução na hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) nos grupos 30 minutos e 60 minutos com IM de $79,0 \pm 5\%$ e $59 \pm 11\%$, 1 h após o término da corrida. O grupo 15 minutos apresentou redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,01$) 0,5 h após término da corrida com IM de $29,0 \pm 10\%$.

No 21º dia após a IR da pata (fig. 7C), notou-se que os grupos 30 minutos e 60 minutos tiveram diminuição significativa ($p < 0,001$) na hiperalgesia mecânica por até 1 h após o término da corrida, apresentando IM de $76,0 \pm 7\%$ em 1 h e $56,0 \pm 10\%$ em 0,5 h, nos respectivos grupos. O grupo 15 minutos apresentou redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,01$) IM de $29,0 \pm 10\%$, 0,5 h após a corrida.

○ Não Exer ● 15 minutos ● 30 minutos ● 60 minutos

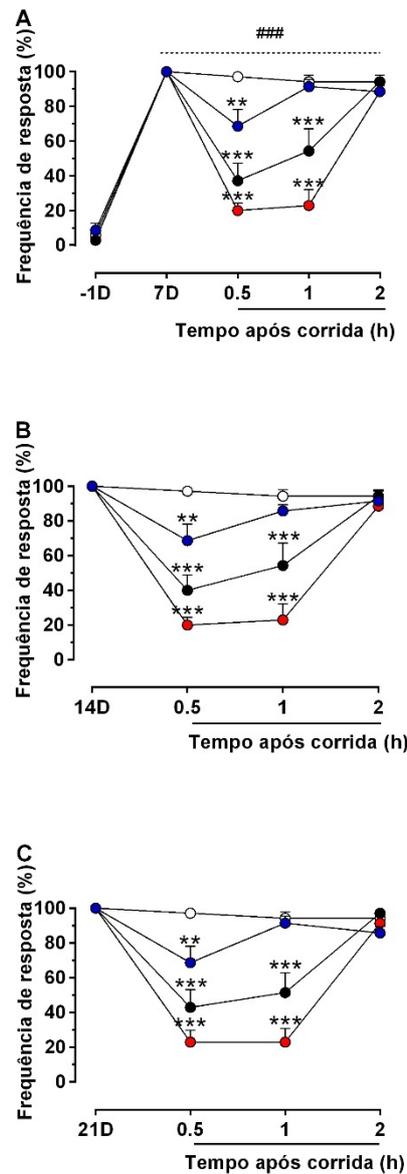


Figura 7: Efeito de diferentes volumes da corrida contínua na hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR. Sétimo (7^o, painel A), décimo quarto (14^o, painel B) e vigésimo primeiro (21^o) dia após IR da pata (painel C). Os valores representam a média \pm EPM (n = 8 animais). #### $p < 0,001$ quando comparados com o tempo pré (-1d) IR da pata, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo Não Exer (controle). Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Grupo Não Exer: grupo que não realizou exercício, grupo 15 minutos: grupo que realizou corrida por 15 minutos na velocidade de 16 m/min, grupo 30 minutos: grupo que realizou corrida por 30 minutos na velocidade de 16 m/min, grupo 60 minutos: grupo que realizou corrida por 60 minutos na velocidade de 16 m/min. D: dia; h: hora (s); m/min: metros por minuto. IR: isquemia e reperfusão.

4.3 EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA EM DIFERENTES FREQUÊNCIAS SEMANAIS SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA

A figura 8A ilustra os resultados referentes as avaliações da duração do efeito da corrida na hiperalgesia mecânica, avaliadas antes e após as corridas, realizadas com frequências semanais de três ou cinco vezes. As avaliações foram realizadas no início e no final de cada semana, por 3 semanas consecutivas. As corridas foram realizadas a 16 m/min de velocidade durante 30 minutos.

Na primeira semana de corrida no grupo 3 vezes (7^o - 11^o dia após IR, fig. 8A-B) observou-se redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) por até 1 h após a corrida no 7^o dia com IM de $56,0 \pm 14\%$ em 0,5 h. No 11^o dia, observou-se redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) 1 h após a corrida com IM de $47,0 \pm 12\%$ em 0,5 h. No grupo 5 vezes (7^o - 11^o dia após IR, fig. 3A-B) também foi observado a redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) por até 1 h após a corrida no 7^o dia com IM de $50,0 \pm 20\%$ em 1 h. Já no 11^o dia a redução da hiperalgesia mecânica durou por 0,5 h após corrida com IM de $35,0 \pm 15\%$ em 0,5 h.

Na segunda semana de corrida contínua o grupo 3 vezes (14^o-18^o dia após IR, fig. 8C-D) observou-se a redução da hiperalgesia mecânica por até 0,5 h ($p < 0,05$) com IM de $34,0 \pm 10\%$ em 0,5 h. Já o grupo 5 vezes apresentou redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) por até 1 h com IM de $47,0 \pm 12\%$ no tempo 0,5 h após a corrida. No 18^o dia ambos os grupos avaliados não apresentaram redução da hiperalgesia mecânica quando comparados ao grupo Não Exer (controle) após o término da corrida.

Na terceira semana de corrida (21^o - 25^o dia após IR, fig. 8E-F) também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos, tanto no 21^o quanto no 25^o dia após IR.

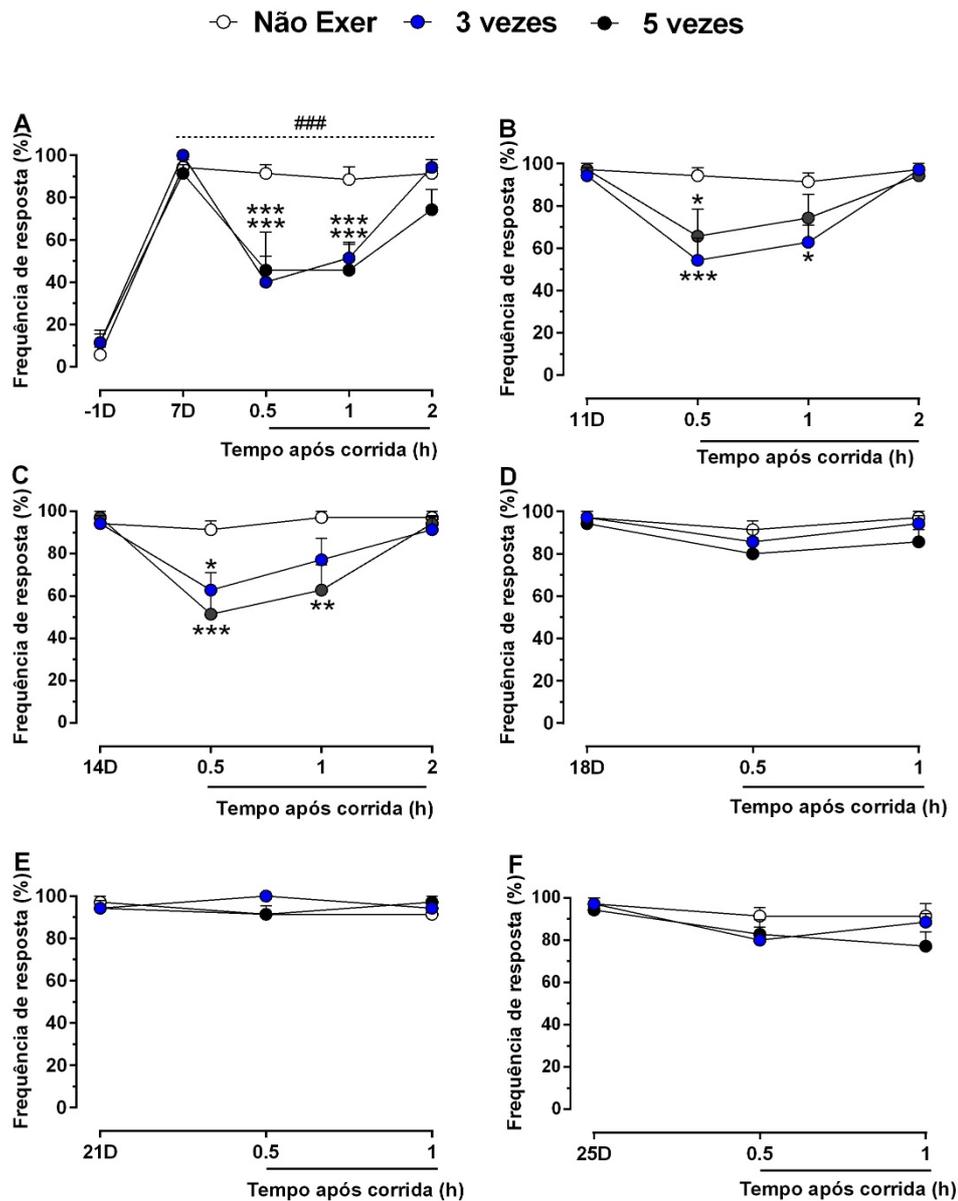


Figura 8: Efeito da frequência semanal da corrida contínua (16 m/min por 30 minutos) na hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR da pata. Avaliações nos dias 7 (painel A), 11 (painel B), 14 (painel C), 18 (painel D), 21 (painel E) e 25 (painel F) após IR da pata. Os valores representam a média \pm EPM ($n = 8$ animais). ### $p < 0,001$ quando comparados com o tempo pré (-1d) IR da pata, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo Não Exer (controle). Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Não Exer: grupo que não realizou exercício, grupo 3 vezes: grupo que realizou a corrida 3 vezes na semana, grupo 5 vezes: grupo que realizou a corrida 5 vezes na semana. D: dia; h: hora (s); m/min: metros por minuto. IR: isquemia e reperfusão

4.4 EFEITO DO AUMENTO DA VELOCIDADE NA CORRIDA CONTÍNUA SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados ilustrados na figura 9 mostram as avaliações do efeito anti-hiperalgésico (análise do decurso temporal) das corridas contínuas realizadas com frequência de três ou cinco vezes por semana com aumento na velocidade semanal. As avaliações também foram realizadas no início e no final de cada semana e por três semanas consecutivas.

Na primeira semana de corrida no grupo três vezes (7° - 11° dia após IR, fig. 9A-B) observou-se redução da hiperalgesia mecânica por até 1 h após a corrida tanto no 7° ($p < 0,01$) e 11° dia ($p < 0,001$) após a IR da pata (fig. 9A-B) com IM de $(47,0 \pm 12\%$ e $40,0 \pm 8\%$, nos respectivos dias) em 0,5 h comparado ao grupo Não Exer. No grupo cinco vezes (7° - 11° dia após IR, fig. 9A-B) também foi observada redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) por até 1 h após a corrida no 7° e no 11° dia com IM de $63,0 \pm 10\%$ e $35,0 \pm 3\%$, respectivamente, após 0,5 h da corrida quando comparado ao grupo Não Exer.

Na segunda semana de corrida (14° - 18° dia após IR, fig. 9C-D) a velocidade foi aumentada em ambos os grupos de 16 m/min para 19 m/min. No grupo três vezes observou-se redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,01$) no 14° dia por até 1 h, com IM de $35,0 \pm 6\%$ no tempo de 0,5 h e no 18° dia a redução da hiperalgesia mecânica foi observada após 1 h após a corrida com IM de $27,0 \pm 9\%$ no tempo de 1 h. No grupo cinco vezes houve redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,01$) no início e no final da semana ($p < 0,001$) por até 1 h com IM de $36,0 \pm 9\%$ e $51,0 \pm 12\%$ no 14° e 18° dias nos tempos 0,5 h respectivamente.

Na terceira semana de corrida contínua (21° - 25° dia após IR, fig. 9E-F) a velocidade foi novamente aumentada em ambos os grupos de 19 m/min para 21 m/min no 21° dia após IR. No grupo três vezes observou-se redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,01$) por até 1 h no 21° dia com IM de $50,0 \pm 8\%$ no tempo 1 h. Já no dia 25 observou-se a redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) por até 1 h com IM de $50,0 \pm 14\%$ em 0,5 h. No grupo cinco vezes também se observou redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) por até 1 h nos dias avaliados com IM de $59,0 \pm 10\%$ e $65,0 \pm 11\%$ nos tempos 0,5 h e 1 h no 21° e 25° dia, respectivamente.

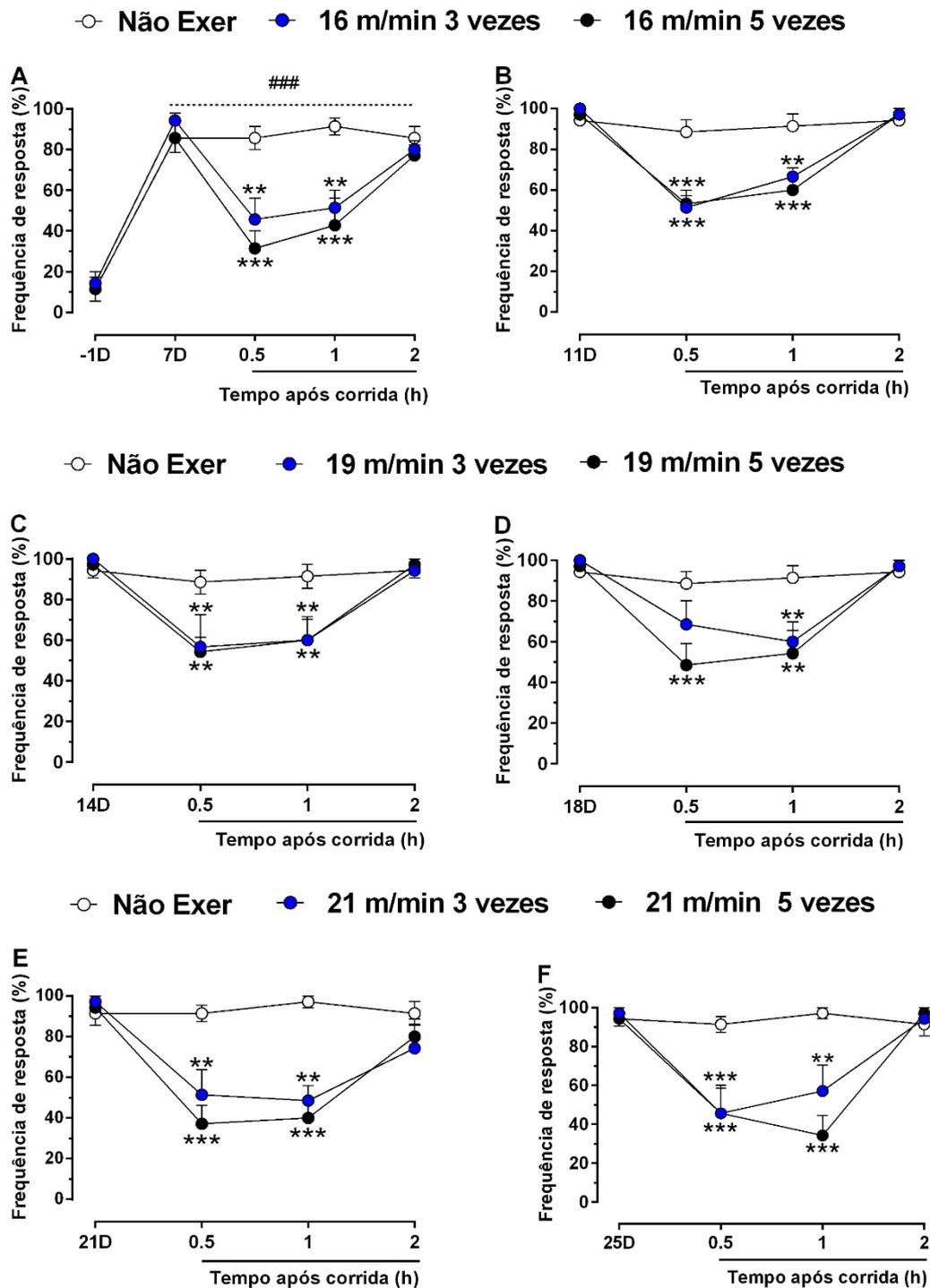


Figura 9: Efeito do aumento da velocidade da corrida contínua sobre a hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR da pata. Avaliações nos dias 7 (painel A), 11 (painel B), 14 (painel C), 18 (painel D), 21 (painel E) e 25 (painel F) após IR da pata. Os valores representam a média \pm EPM ($n = 8$ animais). ### $p < 0,001$ quando comparados com o tempo pré (-1d) IR da pata, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Não Exer (controle). Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Não Exer: grupo que não realizou exercício, grupo 3 vezes: grupo que realizou corrida contínua por 3 vezes na semana com aumento na velocidade nos dias 14 e 21, grupo 5 vezes: grupo que realizou corrida contínua por 5 vezes na semana com aumento na velocidade nos dias 14 e 21. D: dia; h: hora (s); m/min: metros por minuto. IR: isquemia e reperfusão.

4.5 EFEITO DA CORRIDA INTERVALADA COM AUMENTO DE VELOCIDADE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados ilustrados na figura 10 mostram as avaliações do efeito anti-hiperalgésico (em análises do decurso temporal) da corrida intervalada realizadas com frequência de cinco vezes por semana e com o aumento semanal nas velocidades, nos dias 14 e 21. As avaliações foram realizadas no início e no final de cada semana, por três semanas consecutivas.

Na primeira semana de corrida no grupo intervalado (7^o - 11^o dia após IR, fig. 10A-B) foi observada redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) por até 5 h (IM de $74,0 \pm 13\%$ em 0,5 h) após a corrida no 7^o dia e por até 1 h ($69,0 \pm 8\%$ em 0,5 h) no 11^o dia com IM de $74,0 \pm 13\%$ e $69,0 \pm 8\%$ no tempo 0,5 h após a corrida nos respectivos dias. Na segunda semana de corrida com o aumento da velocidade no dia 14^o houve redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) no dia 14^o por até 5 h e no 18^o dia ($p < 0,001$) de até 1 h com IM de $70,0 \pm 12\%$ e $76,0 \pm 6\%$ nos tempos 0,5 h e 1 h nos respectivos dias.

Na terceira semana de treinamento de corrida com o aumento da velocidade de corrida no dia 21 houve a redução da hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$) por até 5 h e no 18^o dia ($p < 0,001$) de até 1 h com IM de $79,0 \pm 8\%$ no tempo 4 h e $65,0 \pm 9\%$ no tempo 1 h, nos respectivos dias.

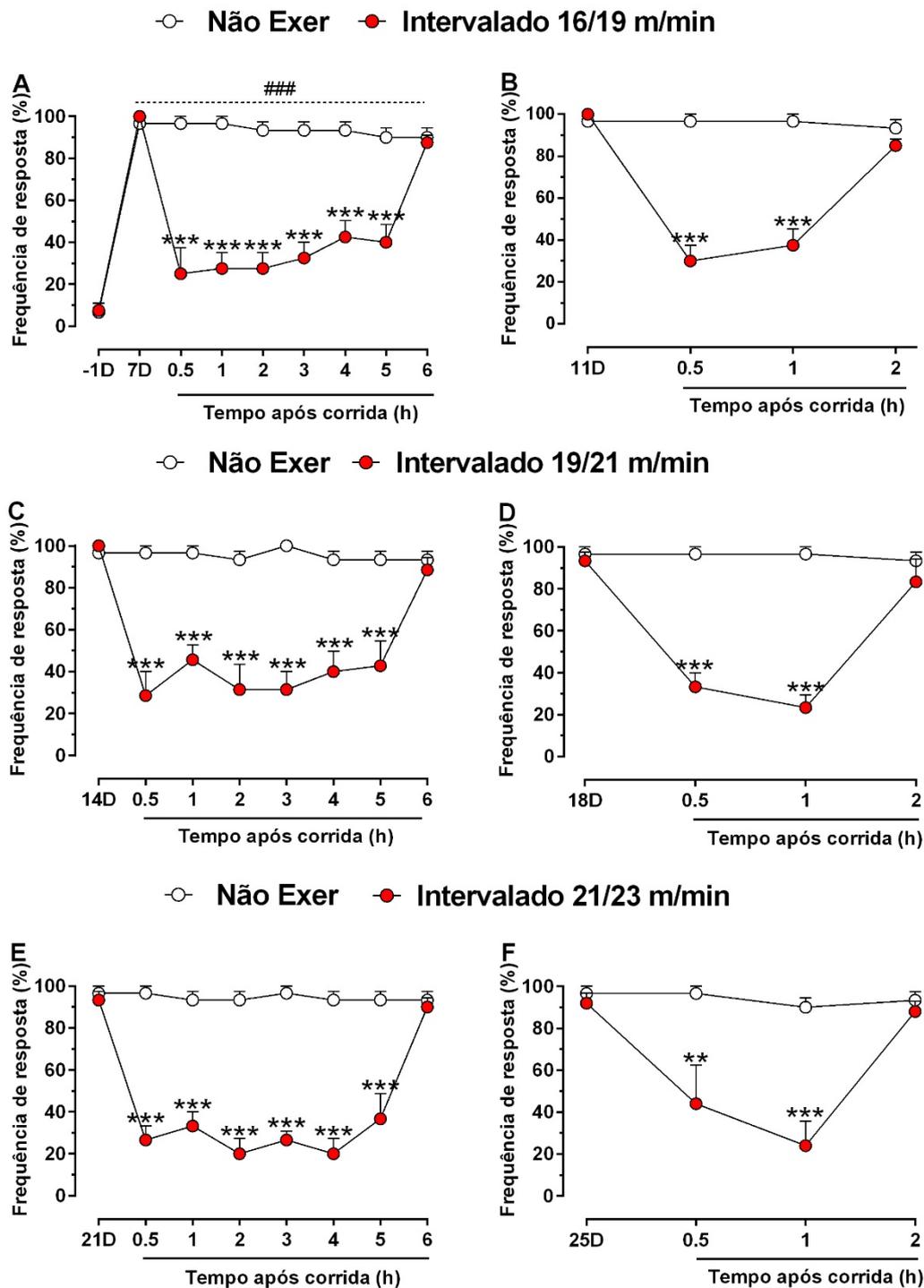


Figura 10: Efeito da corrida intervalada com o aumento da velocidade sobre a hiperalgesia mecânica de animais submetidos a IR da pata. Avaliações nos dias 7 (painel A), 11 (painel B), 14 (painel C), 18 (painel D), 21 (painel E) e 25 (painel F) após IR da pata. Os valores representam a média \pm EPM (n = 8 animais). Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. ### $p < 0,001$ quando comparados com o tempo pré (-1d) IR da pata, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Não Exer (controle). Grupo Não Exer: grupo que não realizou exercício. Grupo intervalado: grupo que realizou a corrida intervalada na velocidade 16/19 m/min, aumentou a velocidade nos dias 14 e 21 para 19/21 m/min e 21/23 m/min, respectivamente. D: dia; h: hora (s); m/min: metros por minuto. IR: isquemia e reperfusão.

4.6 EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO SANGUÍNEO

O lactato sanguíneo foi coletado da cauda dos animais após as sessões de corrida em esteira, exceto na avaliação basal. As coletas de sangue foram realizadas no trigésimo minuto após a corrida contínua ou intervalada. Os dados são apresentados de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 3: Concentrações médias de lactato sanguíneo em diferentes tempos de avaliação.

Grupos	Valores do lactato sanguíneo (mmol/L)		
	Repouso	1ª corrida	5ª corrida
IR + Não Exer	1,65 ± 0,09	2,61 ± 0,20	2,29 ± 0,41
IR + Contínuo	1,64 ± 0,17	2,40 ± 0,19	2,46 ± 0,31
IR + Intervalado	1,66 ± 0,13	2,80 ± 0,32	1,55 ± 0,17

Grupo IR+ Não Exer: animais com IR da pata grupo que correram somente no primeiro e quinto dia intervaladamente (16/19 m/min). Grupo IR + Contínuo: animais com IR da pata que correram por 30 minutos na velocidade de 16 m/min, por 5 dias consecutivos. Grupo IR + Intervalado: animais com IR da pata que correram intervaladamente na velocidade 16/19 m/min por 30 min, por 5 dias consecutivos. Os valores representam a média ± EPM (n = 8 animais). Coleta realizada no trigésimo minuto de corrida. IR: isquemia e reperfusão.

Conforme apresentado na tabela 3, pode-se observar que o grupo IR + Não Exer apresentou um aumento de 0,96 e 0,64 mmol/L após a primeira e a quinta corrida respectivamente, em relação ao repouso. No grupo IR + Contínuo apresentou um aumento de 0,76 e 0,82 (mmol/L) após a primeira e a quinta corrida respectivamente. Já o grupo IR + Intervalado apresentou um aumento de 1,44 e uma redução de 0,11 (mmol/L) após a primeira e a quinta corrida respectivamente.

4.7 EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA OU INTERVALADA SOBRE A EXPRESSÃO DE ERK1/2 E AKT1/2/3 FOSFORILADAS

Os resultados ilustrados na figura 11 demonstram a expressão da ERK1/2 na medula espinal após 30 minutos do 5º dia de treinamento em todos grupos. Observou-se que não houve diferença nas concentrações de ERK1/2 na medula espinal entre os grupos Naive e grupo IR + Não Exer. Já o grupo IR + Contínuo quando comparado ao grupo IR + Não Exer apresentou maior concentração de ERK1/2 ($p < 0,05$). Interessantemente o grupo IR + Intervalado apresentou

menores concentrações de ERK1/2 fosforilada quando comparado ao grupo IR + Não Exer ($p < 0,05$).

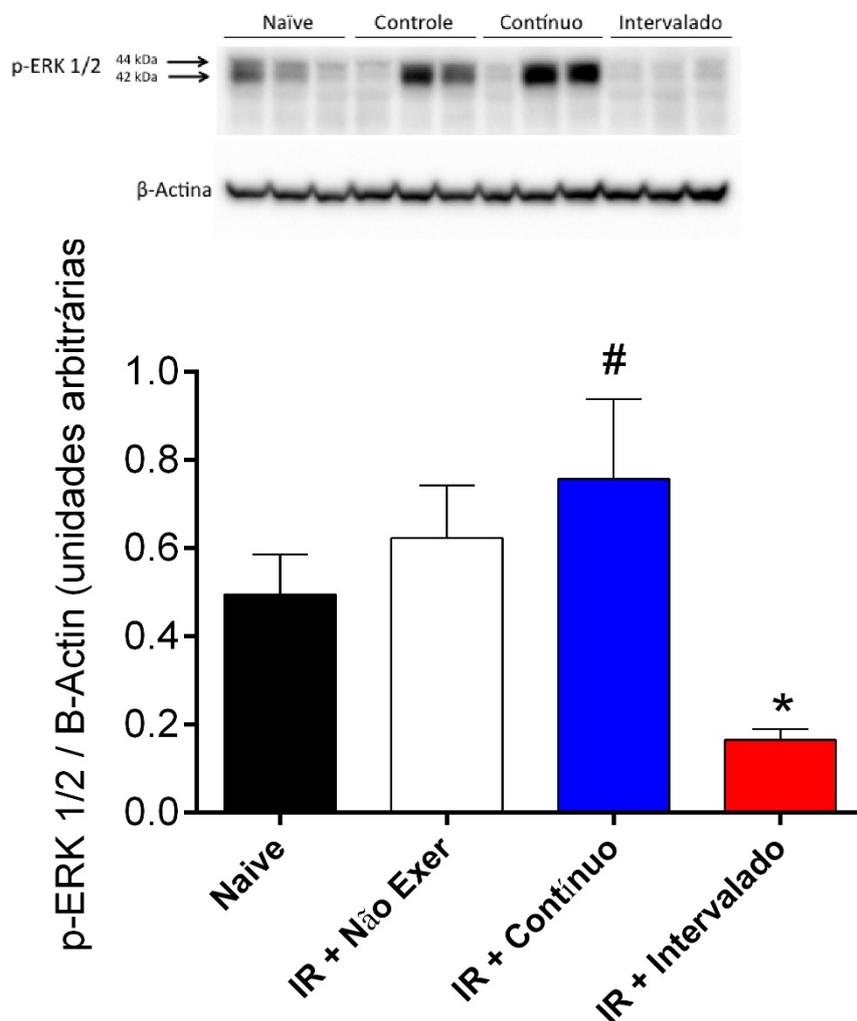


Figura 11: Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações da p-ERK1/2 fosforilada na medula espinal dos animais no 11º dia após IR da pata. Os dados são expressos como a média \pm EPM ($n = 8$ animais). $\#p < 0,05$ quando comparado com o grupo naive; $*p < 0,05$ quando comparado com o grupo Não Exer. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Naive: grupo de animais que não sofreu nenhum procedimento; IR + Não Exer: grupo submetido a IR e não realizou exercício. IR + Contínuo: grupo que realizou a corrida contínua 16 m/min por 30 minutos. Grupo IR + Intervalado: grupo que realizou a corrida intervalada 16/19 m/min por 30 minutos. IR: isquemia e reperfusão.

Os resultados observados na figura 12 demonstram a expressão da AKT1/2/3 fosforilada na medula espinal após 30 minutos do 5º dia de treinamento. Apesar de ser verificado que o grupo IR + Não Exer apresentou diferença na concentração de AKT1/2/3 quando comparado ao grupo Naive e os grupos exercitados apresentaram menores concentrações de AKT1/2/3 do que

o grupo IR + Não Exer, não houve diferença estatística significativa entre todos os grupos analisado

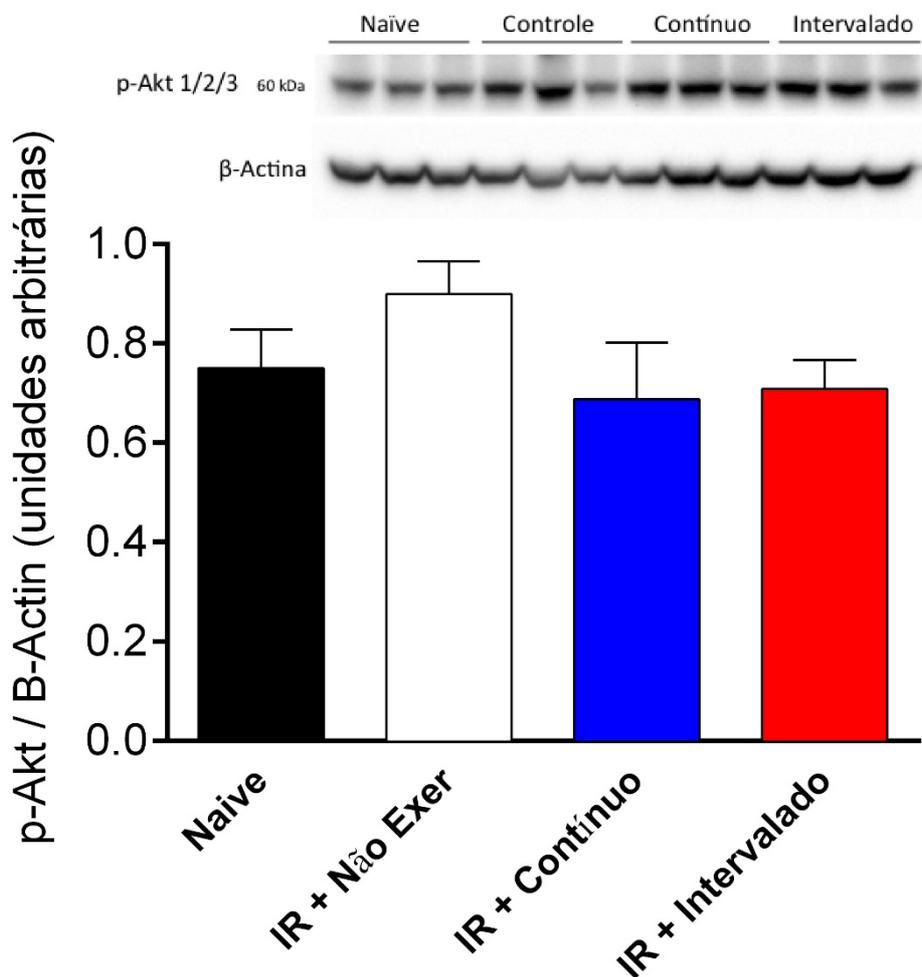


Figura 12: Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações da p-AKT1/2/3 na medula espinal dos animais no 11º dia após IR da pata. Os dados são expressos como a média \pm EPM ($n = 8$ animais). Análise de variância de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Naive: grupo de animais que não sofreu nenhum procedimento; IR + Não Exer: grupo submetido a IR e não realizou exercício. IR + Contínuo: grupo que realizou a corrida contínua 16 m/min por 30 minutos. Grupo IR + Intervalado: grupo que realizou a corrida intervalada 16/19 m/min por 30 minutos. IR: isquemia e reperfusão.

4.8 EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA OU INTERVALADA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS

A concentração de TNF- α no tronco encefálico dos camundongos foi significativamente maior ($p < 0,05$, fig. 13B) no grupo de animais não exercitado que sofreu procedimento de IR da pata quando comparado ao grupo Naive. Entretanto, não se encontrou diferença estatística nas concentrações de TNF- α no córtex pré-frontal e medula espinal quando se compararam estes grupos (fig. 13B-C). Também, se observou que o grupo IR + Contínuo apresentou menores concentrações de TNF- α no tronco encefálico e medula espinal quando comparado com o grupo IR + Não Exer (controle). Em relação ao grupo Intervalado, se notou que as concentrações de TNF- α em córtex pré-frontal, tronco encefálico e medula espinal foram menores ($p < 0,05$) que a observada no grupo IR + Não Exer (controle, fig. 13A-C).

No córtex pré-frontal (fig. 13D) a concentração de IL1- β dos camundongos não apresentou diferença quando comparado o grupo Naive com o grupo IR + Não Exer ($p < 0,05$). No tronco encefálico se observou maiores concentrações de IL1- β (fig. 13E, $p < 0,05$) no grupo IR + Contínuo quando comparado ao grupo IR + Não Exer. Na medula espinal, os grupos IR + Não Exer e os grupos exercitados apresentaram maiores concentrações de IL1- β (fig. 13F, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo Naive, entretanto na comparação entre estes grupos, não houve diferença significativa.

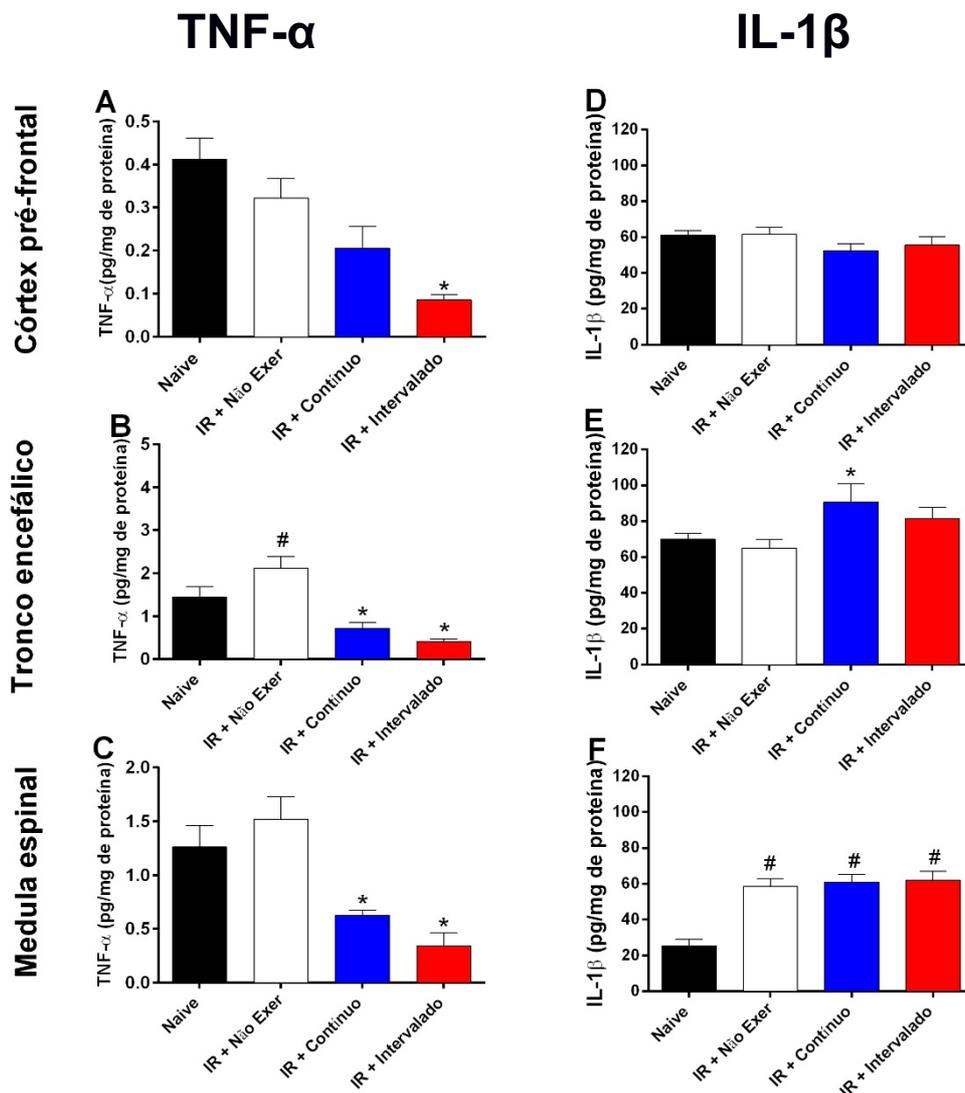


Figura 13: Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias dos animais no 11º dia após IR da pata. Análises das concentrações de TNF- α no córtex pré-frontal (painel A), tronco encefálico (painel B) e medula espinal (painel C). Análises das concentrações de IL-1 β no córtex pré-frontal (painel D), tronco encefálico (painel E) e medula espinal (painel F). Os dados são expressos como a média \pm EPM ($n = 8$ animais). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Naive; * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Não Exer. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Naive: grupo de animais que não sofreu nenhum procedimento; IR + Não Exer: grupo submetido a IR e não realizou exercício. IR + Contínuo: grupo que realizou a corrida contínua 16 m/min por 30 minutos. Grupo IR + Intervalado: grupo que realizou a corrida intervalada 16/19 m/min por 30 minutos. IR: isquemia e reperfusão.

Nas concentrações de IL-6 no córtex pré-frontal e na medula espinal (fig. 14A-C, $p < 0,05$), observou-se que não houve diferença entre os grupos Naive e IR + Não Exer. Entretanto, no tronco encefálico, o grupo IR + Não Exer apresentou maiores concentrações que os animais do grupo Naive. As concentrações de IL-6 no córtex pré-frontal, tronco encefálico e na medula espinal (fig. 14A, B, C, $p < 0,05$) apresentaram concentrações menores nos grupos exercitados quando comparados ao grupo que não realizou exercício (controle). Quando foram comparadas as diferentes formas de corrida, o grupo IR + Intervalado apresentou no córtex pré-frontal e no tronco encefálico menores concentrações de IL-6 que o grupo IR + Contínuo (fig. 14A-B, $p < 0,05$), porém, não houve diferença na medula espinal (fig. 14C, $p < 0,05$).

Nas concentrações de IL-10 no córtex pré-frontal, tronco encefálico e na medula espinal (fig. 14D, E, F, $p < 0,05$), observou-se que não houve diferença entre os grupos Naive e IR + Não Exer. Quando foram comparados os grupos exercitados de forma contínua e de forma intervalada, somente na medula espinal (fig. 14E, $p < 0,05$) ambos os grupos apresentaram maiores concentrações de IL-10 quando comparados ao grupo Não Exer (controle). Curiosamente, o grupo IR + Intervalado apresentou maiores concentrações no córtex pré-frontal e no tronco encefálico de IL-10 quando comparados ao grupo Não Exer. Quando se comparou os grupos exercitados, o modo de corrida não apresentou diferença nas concentrações nas diferentes estruturas analisadas (fig. 14A, B, C, $p < 0,05$).

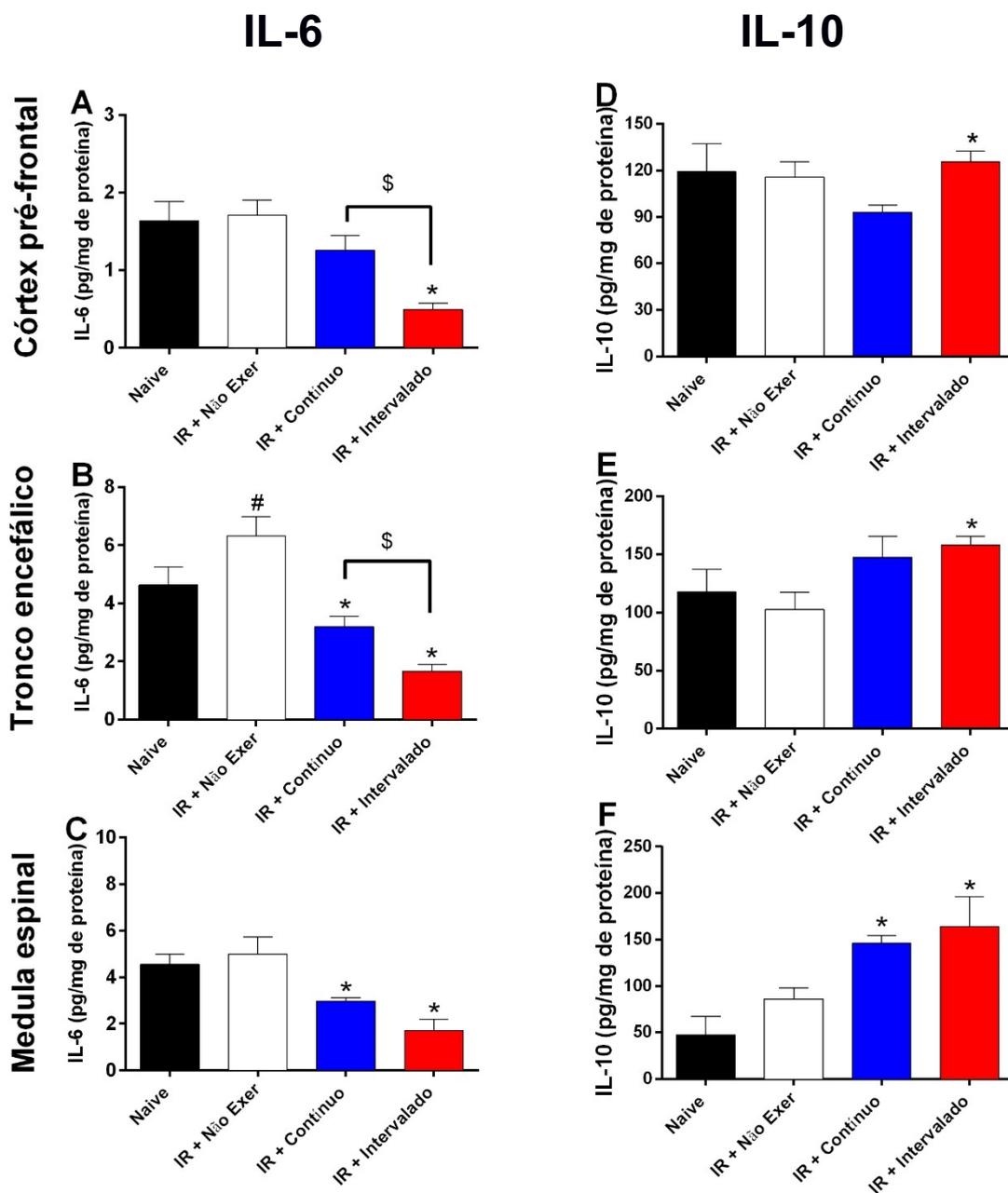


Figura 14: Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações de citocinas anti-inflamatórias dos animais no 11º dia após IR da pata. As concentrações de IL-6 no córtex pré-frontal (painel A), no tronco encefálico (painel B), na medula espinal (painel C). As concentrações de IL-10 no córtex pré-frontal (painel D), no tronco encefálico (painel E), na medula espinal (painel F). Os dados são expressos como a média \pm EPM ($n = 8$ animais). # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo naive; * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo IR + Não Exer. \$ $p < 0,05$ quando são comparados os grupos exercitados. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Naive: grupo de animais que não sofreu nenhum procedimento; IR + Não Exer: grupo submetido a IR e não realizou exercício. IR + Contínuo: grupo que realizou a corrida contínua a velocidade 16 m/min por 30 minutos. Grupo IR + Intervalado: grupo de animais que realizou a corrida intervalada a velocidade 16/19 m/min. IR: isquemia e reperfusão.

4.9 EFEITO DAS CORRIDAS CONTÍNUA E INTERVALADA NO DANO OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE

Os resultados apresentados na Figura 15A mostram que no córtex pré-frontal o grupo IR + Não Exer apresentou concentrações maiores de MDA que o grupo Naive ($p < 0,05$). Quando comparados os grupos exercitados com o grupo IR + Não Exer ambos grupos exercitados apresentaram menores concentrações de MDA ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), para os grupos corrida contínua e intervalada. No tronco encefálico, o grupo IR + Não exer apresentou concentrações de MDA menores ($p < 0,05$) que o grupo Naive, já o grupo IR + Intervalado apresentou concentrações maiores ($p < 0,05$) que o grupo IR + Não Exer (figura 15B).

Na medula espinal, o grupo IR + Não Exer não apresentou diferença significativa quando comparados aos grupos Naive e ao grupo IR + Intervalado. Porém o grupo IR + Contínuo apresentou menores concentrações de MDA que o grupo IR + Não Exer ($p < 0,01$, Figura 15C).

Na figura 15D observou-se que em relação as concentrações de proteínas carboniladas no córtex pré-frontal não houveram diferenças significativas entre os grupos IR + Não Exer, Naive e o grupo IR + Intervalado. No entanto, o grupo IR + Contínuo apresentou concentrações maiores ($p < 0,05$) de proteínas carboniladas no córtex pré-frontal que o grupo IR + Não Exer.

Na figura 15E observou-se no tronco encefálico maiores concentrações das proteínas carboniladas nos grupos IR + Não Exer ($p < 0,05$) e no grupo IR + Contínuo ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo Naive. O grupo IR + Intervalado apresentou menores concentrações de proteínas carboniladas quando comparado ao grupo IR + Não Exer ($p < 0,001$).

Na figura 15F não se observou diferença significativa nas concentrações das proteínas carboniladas na medula espinal quando comparados os grupos IR + Não Exer, IR + Contínuo com o grupo Naive. O grupo IR + Intervalado apresentou concentrações menores de proteínas carboniladas quando comparados aos grupos Naive ou grupo IR + Não Exer ($p < 0,001$).

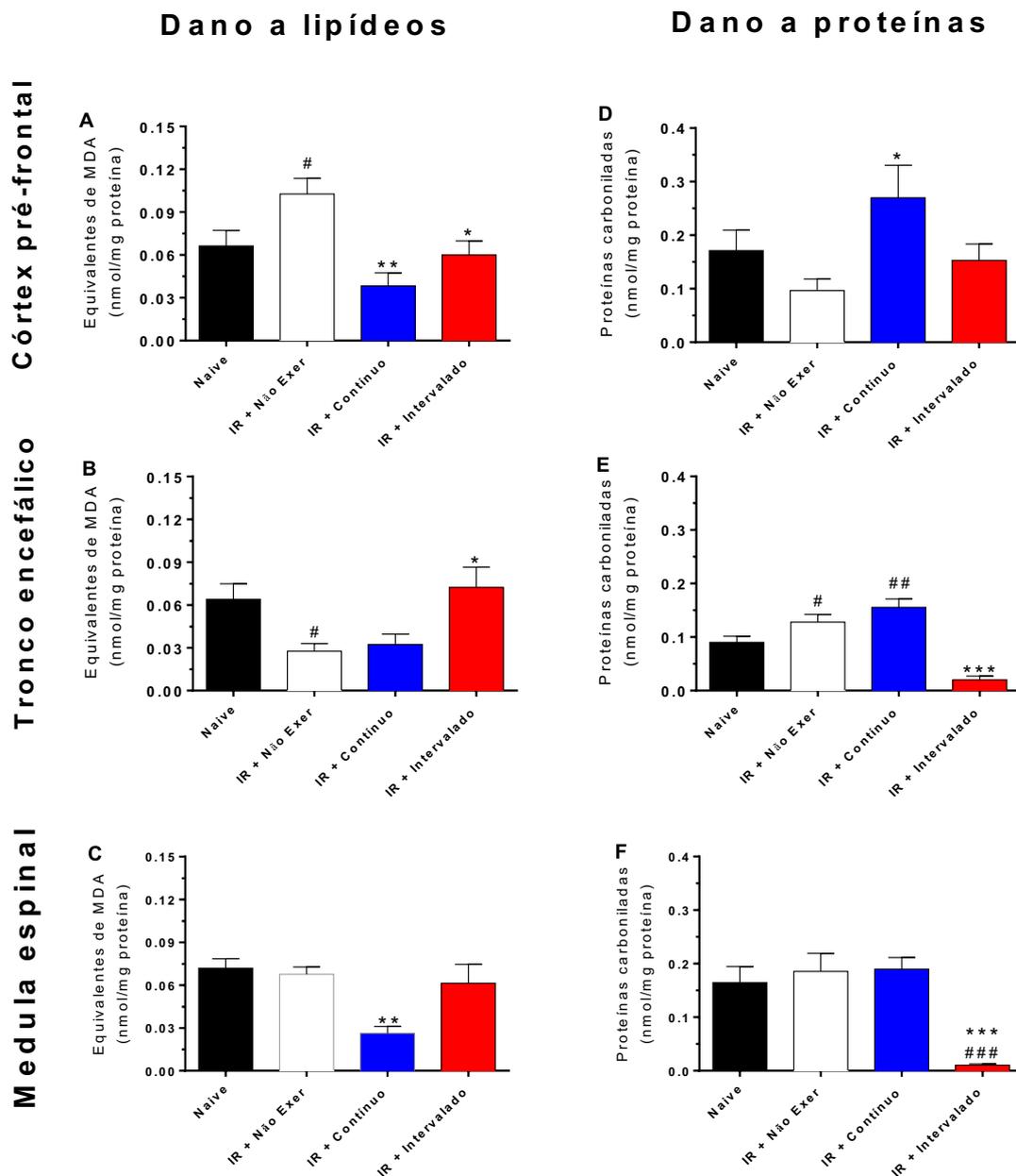


Figura 15: Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações Malondialdeído (MDA) e das proteínas carboniladas nos animais no 11º dia após IR da pata. As concentrações MDA no córtex pré-frontal (painel A), tronco encefálico (painel B), medula espinal (painel C). As concentrações das proteínas carboniladas no córtex pré-frontal (painel D), tronco encefálico (painel E), medula espinal (painel F); Os dados são expressos como a média \pm EPM ($n = 8$ animais). $\#p < 0,05$, $##p < 0,01$ e $###p < 0,001$ quando comparado com o grupo naive; $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$ quando comparado com o grupo IR + Não Exer. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Naive: grupo de animais que não sofreu nenhum procedimento; IR + Não Exer: grupo submetido a IR sem exercício. IR + Contínuo: grupo que realizou a corrida contínua a velocidade 16 m/min por 30 minutos. Grupo IR + Intervalado: grupo de animais que realizou a corrida intervalada a velocidade 16/19 m/min por 30 min. IR: isquemia e reperfusão.

Os resultados apresentados na Figura 16A demonstram que no córtex pré-frontal o grupo Naive apresentou concentrações menores de CAT quando comparado ao grupo IR + Não Exer e aos grupos exercitados ($p < 0,05$). No tronco encefálico (figura 16B) o grupo IR + Não Exer apresentou concentrações maiores de CAT quando comparado ao grupo Naive ($p < 0,05$). Quando comparados os grupos exercitados apenas o grupo IR + intervalado apresentou concentrações maiores de CAT que o grupo IR + Não Exer ($p < 0,001$). Na medula espinal (figura 16C) não houve diferença significativa entre os grupos nas concentrações de CAT.

Na figura 16D no córtex pré-frontal o grupo IR + Não Exer apresentou menores concentrações de SOD que o grupo Naive ($p < 0,05$). Já os grupos IR + Contínuo e o grupo IR + intervalado apresentaram concentrações maiores de SOD no córtex pré-frontal que o IR + Não Exer ($p < 0,05$).

Na figura 16E observou-se que apenas o grupo IR + Contínuo apresentou maiores concentrações de SOD no tronco encefálico que o grupo Naive e o grupo IR + Não Exer ($p < 0,001$).

Na medula espinal observado na figura 16F, os grupos IR + Não Exer, intervalado e contínuo apresentaram menores concentrações de SOD ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) respectivamente quando comparados ao grupo Naive.

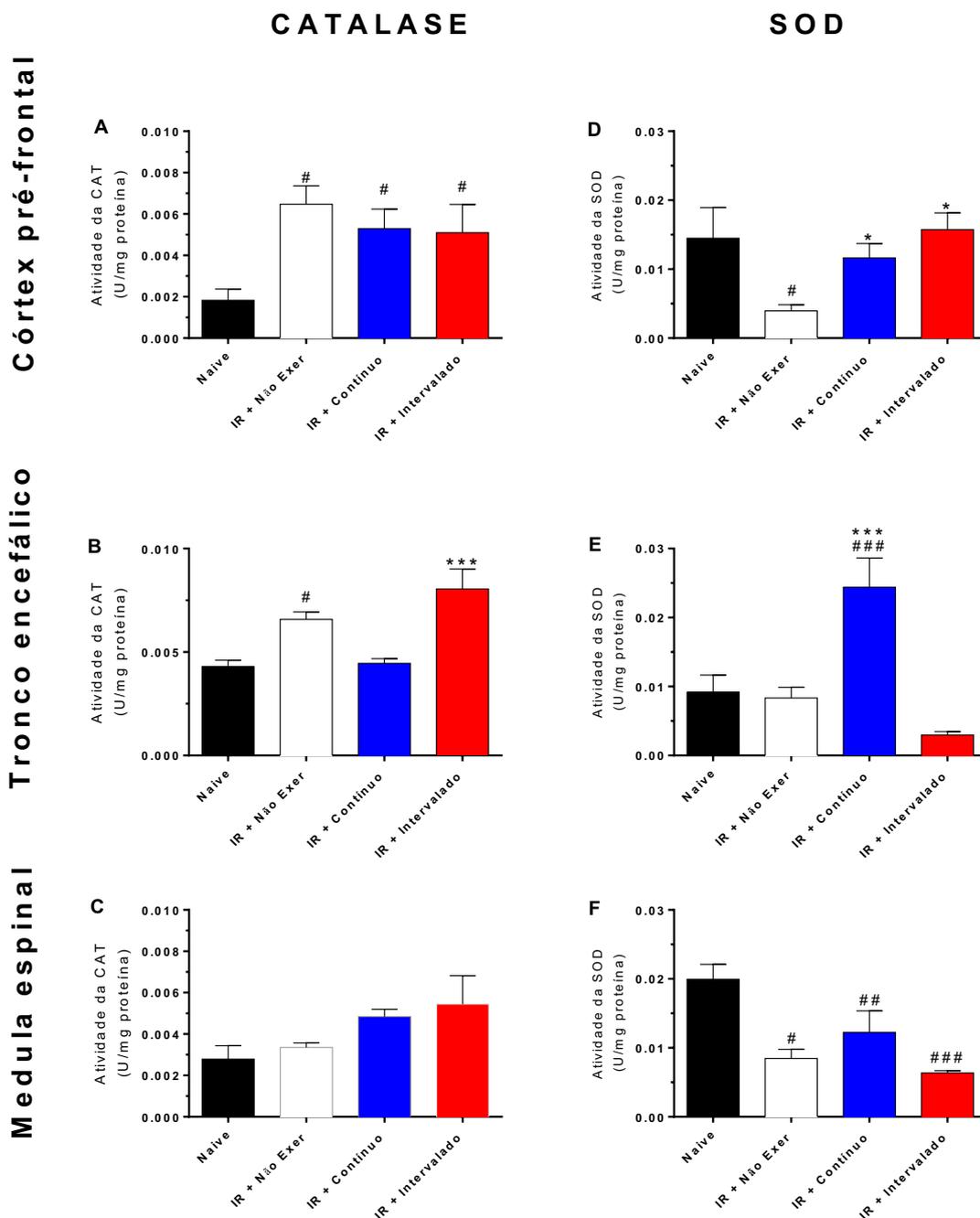


Figura 16: Efeito da corrida contínua e intervalada nas concentrações superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT) nos animais no 11º dia após IR da pata. As concentrações e catalase (CAT) no córtex pré-frontal (painel A), tronco encefálico (painel B), medula espinal (painel C). As concentrações superóxido-dismutase (SOD) no córtex pré-frontal (painel D), tronco encefálico (painel E), medula espinal (painel F); Os dados são expressos como a média \pm EPM ($n = 8$ animais). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo naive; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo IR + Não Exer. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Naive: grupo de animais que não sofreu nenhum procedimento; IR + Não Exer: grupo submetido a IR sem exercício. IR + Contínuo: grupo que realizou a corrida contínua a velocidade 16 m/min por 30 minutos. Grupo IR + Intervalado: grupo de animais que realizou a corrida intervalada a velocidade 16/19 m/min por 30 min.

4.10 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDÉRGICOS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELAS CORRIDAS CONTÍNUA E INTERVALADA

Os resultados da figura 17A demonstram que a administração i.p. de naloxona (1 mg/kg, um antagonista não-seletivo para receptores opioides) ou salina (10 ml/kg) não alteraram a hiperalgesia mecânica ($p < 0,05$) dos animais não exercitados. No entanto, a administração de 1 mg/kg de naloxona foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico da morfina (dose 5 mg/kg s.c.) (fig. 17A, $p < 0,05$). Além disso, a mesma dose de naloxona também foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico produzido pela corrida contínua (fig. 17A, $p < 0,001$).

Interessantemente, os resultados das figuras 17A e 17B mostram tanto a dose de 1 mg/kg quanto a dose de 10 mg/kg de naloxona não foram capazes de prevenir o efeito antihiperálgico causado pela corrida intervalada.

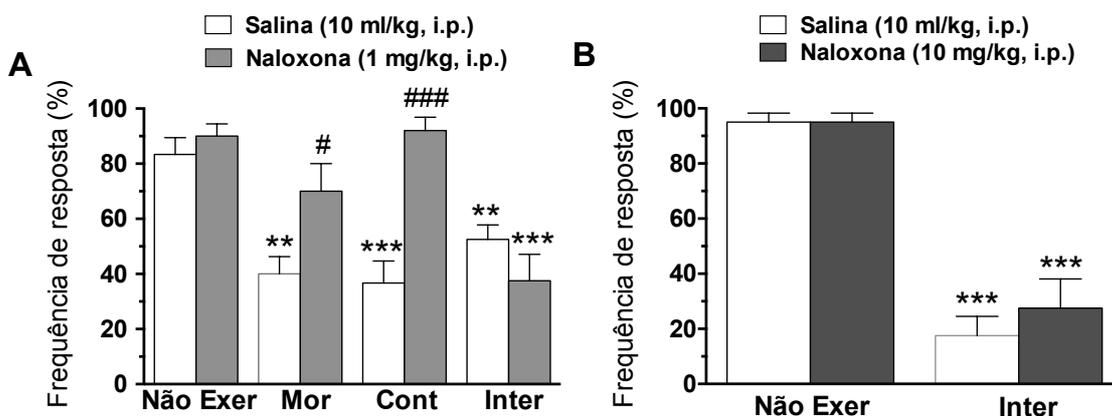


Figura 17: Avaliação da participação dos receptores opioidérgicos no efeito anti-hiperalgésico da corrida contínua e da corrida intervalada. Avaliação da administração de naloxona (1 mg/kg, i.p.) no efeito anti-hiperalgésico da morfina e das corridas contínua e intervalada, painel A). Avaliação da administração de naloxona (10 mg/kg, i.p.) no efeito anti-hiperalgésico da corrida intervalada, painel B). Os dados são expressos como a média \pm EPM ($n = 8$ animais). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Não Exer; # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Salina + morfina (5 mg/kg s.c.); ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Salina + Contínuo; Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Grupo Não Exer: grupo que não realizou exercício, grupo Cont: grupo que realizou a corrida contínua 16 m/min por 30 minutos, grupo Inter: grupo que realizou a corrida intervalada 16/19 m/min por 30 minutos; grupo Mor: grupo de animais que não correu e apenas recebeu morfina.

5. DISCUSSÃO

A hipotalgesia induzida pelo EF agudo em seres humanos saudáveis já foi bem estudada, embora o efeito da corrida em indivíduos com dor crônica de origem neuropática ainda necessita de mais estudos¹⁹. Está bem estabelecido em vários modelos animais de dor neuropática, que o EF reduz a hiperalgisia. Além disso, especificamente utilizando o protocolo de corrida em esteira rolante, tem sido demonstrado em modelo de ligadura parcial do nervo isquiático²²⁶, ligadura crônica do nervo isquiático²⁰, esmagamento do nervo isquiático²², ligadura da raiz dorsal¹⁹¹ que a corrida na esteira é efetiva.

No entanto, após a constatação dos benefícios do EF na neuropatia, a grande questão que agora permanece e que as pesquisas estão se direcionando é conhecer a intensidade, duração e frequência semanal de prescrição de corrida que produz o melhor efeito analgésico induzido pelo EF. Além disso, a maioria dos estudos com a SDRC-I analisaram apenas a fase precoce (inflamatória), fato que pode explicar o porquê a fisiopatologia da fase fria ou tardia (neuropática) é pobremente compreendida.

O primeiro estudo a investigar os efeitos do EF na DPIC em modelo animal foi realizado por Laferrière et al.¹². Investigando aspectos fisiopatológicos envolvidos na fase quente (precoce) da SDRC-I os autores descobriram que o lactato está aumentado no músculo da pata posterior de ratos nas primeiras 48 h após a IR. Sabendo que o EF é um meio pelo qual o lactato muscular pode ser aumentado, os pesquisadores mostraram que o EF aumentou as concentrações de lactato muscular, além das concentrações já aumentadas pelo procedimento de IR e com isso exacerbando a hiperalgisia mecânica. No entanto, os autores também demonstraram que no sétimo e no décimo quarto dia após IR e EF, as concentrações musculares de lactato já estão normalizadas, com valores semelhantes aos encontrados no grupo Sham ou na pata contralateral à IR.

Com base nessas informações, Martins et al.²³ demonstraram que uma única sessão ou sessões diárias de natação realizadas a partir do sétimo dia (quando as concentrações de lactato muscular já estão normalizadas) pode reduzir a hiperalgisia mecânica em camundongos com DPIC. No entanto, utilizando a natação como modelo para realização de EF a principal limitação é

a dificuldade em controlar a intensidade do EF. Assim, para evoluir no conhecimento acerca dos benefícios do EF no tratamento da SDRCL, aqui se escolheu a esteira rolante, a fim de se analisar o efeito da intensidade e de outros parâmetros de prescrição de EF.

5.1 ANÁLISE DA INTENSIDADE DO EF

Os resultados demonstraram que a corrida contínua reduziu a hiperalgesia mecânica em camundongos com DPIC da pata e que esse efeito é dependente da velocidade da corrida (intensidade). Várias intensidades de EF têm sido utilizadas em pesquisas pré-clínicas e atualmente é desconhecido se há uma intensidade específica de EF necessária para produzir hipoalgesia. Bobinski e colaboradores demonstraram que a corrida na esteira de baixa intensidade reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio em camundongos com esmagamento do nervo isquiático^{22,187,192}. Safakhah et al.²⁰ submetem ratos com constrição crônica do nervo isquiático, a três semanas de corrida na esteira de intensidade moderada e evidenciaram redução da alodinia mecânica e hiperalgesia térmica ao calor. Na modalidade de exercícios de alta intensidade, Cobianchi et al.²¹ observaram a diminuição da alodinia mecânica em camundongos submetidos a ligadura do nervo isquiático. Os animais realizaram sessões de treinamento com intensidade progressiva na mesma sessão. Iniciavam a corrida a 20 cm/s e a cada 5 minutos aumentava 2 cm/s até chegar à 52 cm/s por até 60 minutos de treinamento.

Nesta mesma linha de raciocínio, Kim et al.²²⁷ observaram em ratos submetidos a constrição crônica do nervo isquiático, treinados em intensidade alta e progressiva na mesma sessão, apresentaram diminuição da alodinia mecânica e térmica. Por outro lado, no estudo de Wakaizumi et al.²²⁶, com camundongos submetidos a ligadura parcial do nervo isquiático, treinados em duas intensidades diferentes de corrida na esteira (6 m/min e 12 m/min). A melhor resposta hipoalgéica foi a de menor intensidade. Assim, nota-se que protocolos de corrida na esteira com diferentes intensidades parecem reduzir a hiperalgesia em diferentes modelos de dor neuropática. No presente estudo, corroborando com a literatura, todas as intensidades utilizadas - que variaram de

baixa a alta intensidade - foram efetivas em reduzir a hiperalgesia, no entanto, as intensidades de moderada a alta foram as mais efetivas.

Em estudos clínicos, pesquisadores tem usado vários protocolos de EF, incluindo a prescrição da intensidade do EF com base em porcentagens do VO_2 máx ou da frequência cardíaca máxima ou mesmo auto escolhida. Resultados de estudos da hipoalgesia induzida pelo EF parece indicar que ela ocorre mais consistentemente após o exercício de alta intensidade^{184,228,229}. Embora em grande parte dos estudos o modelo de dor avaliada é do tipo experimental. Porém, em uma revisão sistemática, quando os efeitos de diferentes intensidades (alta e baixa) são avaliados em pacientes com osteoartrite, observaram que os há poucos artigos que comparam programas de exercícios de alta e baixa intensidade na osteoartrite e ainda ressaltam a necessidade de mais estudos investigando a relação dose-resposta em programas de EF²³⁰.

O estudo da influência da intensidade no efeito hipoalgésico induzido pelo EF é de extrema relevância, visto que a intensidade pode ser o ponto chave na prescrição do exercício na qual induz a ativação de diferentes sistemas endógenos responsáveis em produzir analgesia. Exemplos, são os sistemas opioide e endocanabinoides (ECB). Tem sido demonstrado que a liberação dos ECB é dependente da intensidade do EF. Raichlen et al.²³¹ examinaram os níveis circulantes de ECB após exercício aeróbio (corrida na esteira) em quatro diferentes intensidades em corredores amadores. Eles mostraram que a sinalização ECB é dependente da intensidade, com mudanças significativas dos ECB circulantes observada após exercício de intensidade moderada, mas não de intensidade muito baixa ou muito alta.

5.2 ANÁLISE DA DURAÇÃO DO EF

No presente estudo, verificou-se que todos os camundongos com DPIC que correram por 15, 30 ou 60 minutos apresentaram redução da hiperalgesia, ação induzida pela corrida. Sendo que o grupo que correu por 15 minutos apresentou um efeito mais breve (apenas 0,5 h após corrida), e os animais que correram por 30 e 60 minutos apresentaram efeito mais duradouro (por 1 h), no entanto, não diferindo entre os grupos.

Tanto a realização de poucos minutos até horas de EF extenuante pode induzir a produção e liberação de substâncias endógenas com função analgésica e/ou anti-inflamatória. Tem sido mostrado que o exercício agudo ou crônico induz adaptações metabólicas extensas no músculo esquelético e em outros órgãos como por exemplo, tecido adiposo e fígado, como a biogênese mitocondrial²³².

O exercício exerce seus efeitos por meio de várias vias moleculares e miocinas, tais como o BDNF, IL-6 ou irisina²³³, que não só atuam sobre o próprio músculo por via autócrina / parácrina, mas também medeiam a interação muscular com outros órgãos (sistema nervoso) através de mecanismo endócrino²³⁰. Destaca-se a IL-6 que é uma citocina pleiotrópica com amplos efeitos biológicos. É sintetizada pela contração do músculo esquelético e liberada na circulação em resposta ao exercício prolongado. Imagina-se que a IL-6 circulante mantém o estado de energia durante o exercício, atuando como um sensor de energia para contração muscular estimulando a produção de glicose²³⁴.

Neste sentido, a maioria dos estudos que utilizam a corrida na esteira geralmente utilizam protocolos de 30 ou 60 minutos de duração. Como estudos mais recentes pode-se citar a pesquisa de Safakhah et al.²⁰ que submeteram ratos com constrição crônica do nervo isquiático, a corrida na esteira por 30 minutos e verificaram redução na alodinia mecânica e hiperalgesia térmica ao calor. Lopez-Alvarez et al.²³⁵ realizaram exercício em esteira rolante por 1 hora e notaram redução da hiperalgesia mecânica e térmica ao calor em ratos submetidos a transecção do nervo isquiático seguida por reparo cirúrgico.

5.3 ANÁLISE DO EFEITO DA CORRIDA CONTÍNUA REGULAR POR TRÊS SEMANAS, FREQUÊNCIA SEMANAL E DO AUMENTO SEMANAL DA VELOCIDADE

Após estabelecer a intensidade (velocidade) e duração (volume) da corrida que melhor reduziu a hiperalgesia mecânica (16 m/min por 30 min) nos animais com IR da pata, o segundo passo foi avaliar o efeito destes parâmetros quando aplicados diariamente, mimetizando o EF regular (realizado por três semanas consecutivas) e ainda avaliar o efeito da frequência semanal. Apesar de não apresentarem diferença estatística do efeito anti-hiperalgésico entre os protocolos, foi observado que os protocolos de corrida testados (três e cinco

vezes por semana) inicialmente apresentaram redução da hiperalgesia mecânica por 1 h somente até o final da primeira e início da segunda semana de corrida.

Esse fenômeno pode estar relacionado a uma série de circunstâncias, sendo o principal evento o fato de que a intensidade e o volume de corrida não foram alterados e assim, após a primeira semana de treinamento, estes parâmetros não foram fortes o suficiente para ativar os sistemas endógenos de controle da dor. Por este motivo, no experimento seguinte, testou-se o efeito do aumento da intensidade semanalmente. Corroborando a hipótese de trabalho, observou-se que com o aumento semanal das intensidades (16 m/min na primeira semana, 19 m/min na segunda semana e 21 m/min na terceira semana) o efeito anti-hiperalgésico de 1 h induzido pela corrida persistiu por três semanas até o final do protocolo de corrida.

Os trabalhos relacionados ao aumento programado de intensidade do exercício em esteira em modelos animais com dor neuropática apresentam diversas configurações. No grupo de pesquisa de Cobianchi et al., os estudos destacam-se por aumentar a intensidade (2 cm/s) a cada 5 minutos na mesma sessão em modelos animais de regeneração nervosa associado a hiperalgesia^{21,235,236,237}. Contudo, Chen et al.²³⁸ realizaram treinamento em esteira em ratos diabéticos com alodinia, aumentaram a velocidade e a duração da sessão gradativamente durante duas semanas, de 30 minutos para 60 minutos de duração assim como de 1.2 km/h para 1.5 km/h. Yamaoka et al.²³⁹ em um modelo de ligadura do nervo isquiático em ratos, aplicaram um protocolo com o aumento gradativo da velocidade. Os animais iniciaram com a velocidade de 10 m/min com inclinação da esteira de 10 graus e a cada dia de treinamento a velocidade foi aumentada em 1 m/min por dia até chegar a 20 m/min. Nestes trabalhos verificou-se que o aumento da intensidade ou o volume são importantes para manutenção do efeito anti-hiperalgésico do exercício ao longo do tempo, porém, não se encontraram estudos que realizaram o protocolo de aumento de intensidade no intervalo de tempo semelhante ao presente estudo após 5 dias de treinamento.

Ainda, contrário ao encontrado aqui, Bobinski et al.¹⁹² demonstraram que corrida realizada por duas semanas na mesma intensidade (baixa) foi capaz de

reduzir a hiperalgesia mecânica induzida pelo esmagamento do nervo isquiático de camundongos.

5.4 ANÁLISE DO EFEITO DA CORRIDA INTERVALADA

Após estabelecer um protocolo de corrida regular contínuo efetivo em reduzir a hiperalgesia mecânica em camundongos com DPIC, o foco do estudo voltou-se para a análise da corrida intervalada. Assim, como ponto de partida utilizando os parâmetros pré-estabelecidos para corrida contínua, se determinou um protocolo de corrida intervalada de três semanas. A escolha do exercício intervalado ou corrida intervalada teve como base a literatura especializada e recente que descreveu a utilização desta modalidade no tratamento de diferentes patologias^{151,152,153}. De maneira geral, os exercícios realizados em intervalos com diferentes intensidades apresentam a vantagem de produzirem os mesmos efeitos que o exercício contínuo, porém, com um volume menor de prática²⁴⁰.

Neste estudo, optou-se pela prescrição de um exercício baseado em intervalos com diferentes intensidades (velocidades) como alternativa ao exercício contínuo no modelo animal de DPIC. Percebeu-se após extensa revisão de literatura, que os estudos envolvendo exercício aeróbio em modelos animais não propunham a exploração da corrida intervalada na redução da hiperalgesia em camundongos. Há um campo de possibilidades a ser explorado por esta modalidade de exercícios em doenças que apresentam dor crônica, visto que pessoas com dor tendem a queixar-se mais quando submetidas a esforços monótonos e de longa duração^{241,242}.

A utilização da prescrição de exercícios aeróbios em intervalos de intensidade sobre a dor experimental foi primeiro demonstrada por Kodesh et al.¹⁸⁶ em um estudo no qual foram prescritas duas modalidades de exercício em cicloergômetro, contínuo moderado e intervalado de alta intensidade. Neste estudo vinte e nove homens jovens não treinados foram aleatoriamente designados para o grupo aeróbio contínuo (com intensidade cardíaca de 70% da frequência cardíaca máxima (FCmáx) e grupo intervalado (4 × 4 min a 85% intensidade FCM e 2 min a 60% da FCmáx entre os ciclos) com duração total de

30 minutos. Foram realizados testes de dor experimental térmica e a pressão (algômetro) antes e após as sessões de exercícios. Concluiu-se que o protocolo realizado em intervalos de intensidade produziu efeito analgésico semelhantes ao exercício contínuo.

No presente estudo, surpreendentemente, na aplicação do protocolo de corrida intervalada em camundongos com DPIC foi observado sempre na primeira sessão (início de cada semana) uma redução da hiperalgesia mecânica que perdurou por até 5 h. Observou-se também que o efeito anti-hiperalgésico diminuiu após cinco dias de treinamento para uma hora.

Ainda, na tentativa de quantificar a intensidade da corrida no protocolo com melhor efeito sobre a hiperalgesia, mensurações da concentração de lactato sanguíneo foram realizadas. De acordo com as concentrações de lactato sanguíneo encontradas na primeira sessão de corrida, concluiu-se que a corrida contínua e corrida intervalada ficaram no domínio moderado e pesado, respectivamente. No entanto, no quinto dia de corrida o valor da concentração de lactato sanguíneo do grupo corrida intervalada voltou ao valor basal, enquanto que no grupo corrida contínua o valor permaneceu elevado. Esse achado corrobora com o estudo de Mazzardo-Martins et al.²⁴³ onde verificaram que a natação contínua intensa também aumenta substancialmente a concentração de lactato sanguíneo e que cinco dias de treinamento não altera este valor.

Toti et al., com o objetivo de verificar a produção de lactato sanguíneo em camundongos testaram dois protocolos de exercícios, o primeiro de forma contínua (60% da velocidade máxima por 1000 metros) e o outro de forma intervalada (90% da velocidade máxima por 2 minutos por 1 minuto de recuperação por 1000 metros). Concluíram que o treinamento de forma intervalada e contínua após 20 dias de treinamento reduziram o acúmulo de lactato, sendo que o grupo intervalado apresentou menor acúmulo que o grupo contínuo após 40 dias de treinamento²⁴⁴.

Diferentes protocolos de corrida na esteira têm sido utilizados para reduzir a dor neuropática em diferentes modelos animais de lesão nervosa. No entanto, os estudos não têm estabelecido uma curva resposta de intensidade ou duração “ótima” de corrida para cada modelo estudo. Aqui foi inicialmente determinado as melhores intensidades e duração de corrida no modelo de DPIC em

camundongos, para então estabelecer protocolos de corrida contínua e intervalada, a fim de comparar seus efeitos e mecanismo neurobiológico.

5.5 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.

Aqui, também procurou-se analisar estruturas do CPF, tronco encefálico e medula espinal distantes do local da lesão (IR) mas com provável participação na gênese da hiperalgesia mecânica observada na SDRC-I, pois são regiões responsáveis pela percepção e modulação da dor.

Assim, o direcionamento para estas estruturas tais como por exemplo o CPF, se deu pelo fato de que várias manifestações da SDRC-I sugerem mudanças funcionais no SNC, incluindo mudanças motoras, autonômicas e mudanças na representação cortical⁴⁵. Outras evidências que confirmam o envolvimento do SNC na fisiopatologia da SDRC-I provêm de um relato de caso de microgliose espinal analisado em um cadáver com SDRC do tipo II²⁴⁵ e aumento dos níveis de glutamato no líquido cerebrospinal de pacientes com SDRC⁵⁶.

Estudos de neuroimagem identificaram mudanças associadas a SDRC em várias regiões em centros superiores, incluindo o tálamo, córtex sensorial primário (S1) e secundário (S2) (processamento somatossensorial) córtex cingulado e amígdala (funcionamento emocional), hipocampo e córtex perirrinal (funcionamento da memória) e outras regiões, bem como a conectividade entre esses centros^{57,246-248}. Além disso, tem sido descrito que o CPF modula comportamentos dirigidos a objetivos, emoção e funções cognitivas e desempenha um papel importante no controle da dimensão emocional e cognitiva da dor. Evidências anatômica e fisiológica dão suporte ao papel do CPF na percepção da dor²⁵⁰. Ainda, foi relatado que o CPF sofre uma reorganização anatômica e funcional durante condições dolorosas crônicas^{2451,252}.

Neste sentido, no presente estudo se testou se a IR da pata poderia induzir mudanças bioquímicas no CPF dos camundongos e se os protocolos de corrida contínua e intervalada poderiam contrapor a essas alterações. Os resultados do presente estudo demonstram que as concentrações das citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-6) no CPF dos camundongos não foram alteradas pelo

procedimento de IR e nem pela corrida contínua. No entanto, a corrida intervalada foi capaz de diminuir as concentrações de TNF- α e IL-6, além de aumentar IL-10.

O componente inflamatório já foi demonstrado e discutido no modelo da DPIC, sendo observado como um aumento nas concentrações de NF κ B, TNF- α , IL-1 β e IL-6 no tecido periférico apenas na fase aguda (2 e 48 h) após DPIC em ratos^{12,13}. Interessantemente, tem sido sugerido que o TNF- α desempenha um papel essencial na patogênese da lesão por IR do nervo periférico²⁵³. No entanto, a dosagem da concentração tecidual de TNF- α no CPF de camundongos ainda não tinha sido realizada.

Como o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória mestra ela desempenha papel na ativação de uma cascata inflamatória que envolve a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1 β , IL-6 e IL-8^{14,15,16}. Alterações emocionais e de humor associadas a síndromes de dor crônica são atribuídas a concentrações aumentadas de TNF- α no sistema límbico. Camundongos transgênicos com a expressão aumentada desta citocina no encéfalo exibem atividade exploratória e comportamento emocional alterados²⁵⁴. O aumento das concentrações plasmáticas de TNF- α tem sido encontrado em pacientes com a SDRC-I, inclusive com valores similares a pacientes com osteoartrite¹⁴. Além disso, o tratamento com adalimumabe (um anti-TNF- α) reduziu a hiperalgesia mecânica em pacientes com SDRC-I²⁵⁵.

Em relação ao efeito do exercício no CPF, Liu et al.²⁵⁶ mostraram que natação por 60 min 5 dias por semana por 4 semanas reduziu as concentrações de TNF- α no córtex pré-frontal. Apesar, do fato de que não se encontrou aumento de TNF- α no CPF em camundongos com DPIC, a corrida intervalada diminuiu as concentrações deste, sugerindo que este efeito da corrida sobre o TNF- α possa ter influenciado sobre a hiperalgesia mecânica destes animais, uma vez que o tratamento teve início no sétimo dia após a indução da DPIC. Talvez em futuras avaliações onde se analisem as concentrações de TNF- α , em tempos mais precoces possa encontrar diferença induzida pelo procedimento de IR da pata e assim confirmar o papel do TNF- α no CPF na gênese da hiperalgesia mecânica.

Do mesmo modo, foi o comportamento observado na análise da IL-10. Apesar da concentração desta citocina anti-inflamatória não ser alterada pelo procedimento de IR da pata, a corrida intervalada, mas não a corrida contínua, induziu um aumento significativo dela. Em humanos, tem sido demonstrado que indivíduos com a SDRC-I apresentam menores expressões do RNAm e da concentração de IL-10 e IL-4 no plasma quando comparados com indivíduos controle saudáveis²⁵⁷. Contudo, o efeito do EF sobre a produção de IL-10 já está bem estabelecido²⁵⁸ e no presente estudo foi mostrado que somente a corrida intervalada produziu efeito sobre as concentrações de IL-10 no CPF dos camundongos.

5.6 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NO ESTADO REDOX NO CPF

O processo inflamatório orquestrado pelas citocinas pró-inflamatórias citadas, juntamente com a privação de oxigênio pelo processo isquêmico induz a produção de EROs, as quais reagem com diferentes biomoléculas, tais como proteínas e lipídeos. Isto leva a mudanças ou perda da função e produção de metabólitos tóxicos, caracterizando um estado de estresse oxidativo. A produção destes metabólitos tem sido caracterizada durante eventos isquêmicos podendo causar dano neuronal, indução de resposta inflamatória e finalmente causando dor^{46,259}.

Aqui, também foi analisado o estado oxidativo após IR da pata pela detecção de equivalentes de MDA e de proteínas carboniladas, marcadores de oxidação lipídica e proteica, respectivamente. Além disso, o estado antioxidante, foi analisado pela quantificação da atividade das enzimas SOD e catalase. Estas análises foram realizadas em estruturas chave do SNC (CPF, tronco encefálico e medula espinal) que modulam o processamento nociceptivo envolvidas na patogênese da SDRC-I.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o procedimento de IR da pata aumentou o dano a lipídeos e a atividade da enzima catalase, mas não alterou as concentrações das proteínas carboniladas no CPF dos camundongos e por outro lado diminuiu a atividade da enzima SOD. A presença de dano a lipídeos e a redução da atividade da SOD no CPF concomitante com

a hiperalgesia mecânica indica que a DPIC pode ser mediada pelo dano oxidativo gerado. Comparações diretas com dados da literatura é difícil de se fazer uma vez que não são encontrados estudos, ao menos ao nosso conhecimento, com as mesmas análises e sítios avaliados no presente estudo. Neste sentido, semelhantemente Pathak et al.²⁶⁰ analisaram o estado de estresse oxidativo e inflamatórios de sítios periféricos, espinais e supra-espinais de camundongos com neuropatia periférica (constricção crônica do nervo isquiático). Eles mostraram que após vinte e um dias após lesão nervosa há dano oxidativo à lipídeos e proteínas (MDA e proteínas carboniladas) bem como diminuição das enzimas antioxidantes (catalase) no CPF de ratos.

Os achados apresentados aqui, também mostram que a corrida contínua diminuiu o dano à lipídeos, mas aumentou o dano a proteínas. Contudo, a corrida intervalada somente diminuiu o dano a lipídeos. Em relação a atividade da enzima SOD os dois protocolos de corrida aumentaram a sua atividade. Assim, pode-se sugerir que a tanto a corrida contínua quanto a corrida intervalada reduziram o dano a lipídeos no CPF e parece que este efeito está relacionado a capacidade destas corridas de induzir o aumento da atividade da enzima antioxidante SOD, mas não da catalase e assim reduzir a hiperalgesia mecânica.

Apesar do encéfalo em repouso apresentar gasto energético e fluxo sanguíneo relativamente constante, nele ainda ocorrem adaptações associadas às mudanças oxidativas²⁶¹. Radak et al. demonstraram que uma única sessão de EF, que causou dano oxidativo ao músculo esquelético, fígado e rim²⁶¹, não causou danos ao encéfalo²⁶². A corrida na esteira não alterou as atividades de SOD, CAT e GPX no encéfalo de ratos, em contraste, aos resultados encontrados no presente estudo. No entanto, Somani e Husain²⁶⁴, relataram que os efeitos do exercício sobre as atividades das enzimas antioxidantes são dependentes da região encefálica. Em certas regiões, como o tronco encefálico e o corpo estriado, o treinamento físico resultou em atividades aumentadas de SOD e GPX^{264,265}. Além disso, Aksu et al.²¹⁵ mostraram que a corrida contínua regular realizada em esteira por 12 semanas por 60 min diários não alterou o dano oxidativo a lipídeos, mas aumentou a defesa antioxidante por aumentar a atividade da enzima SOD no CPF de ratos. Assim, aqui se demonstrou, pela primeira vez, que a corrida (contínua ou intervalada) é capaz de reduzir o dano

oxidativo e aumentar a defesa antioxidante no CPF de camundongos com DPIC da pata.

5.7 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO TRONCO ENCEFÁLICO

A modulação da percepção da dor é uma característica importante do processamento fisiológico da dor. As síndromes de dor crônica são especuladas como resultado de processos maladaptivos centrais^{266,267}. A ativação crônica de vias descendentes facilitatórias poderiam mediar estados de dor crônica²⁶⁸. Áreas do tronco encefálico tem sido demonstrado estar ativadas na modulação da dor, incluindo o bulbo ventral rostral, locus coeruleus, o núcleo parabraquial, a área tegmental ventral, o núcleo cuneiformis e a substância cinzenta periaquedutal (PAG)^{269,270,271}.

Pesquisas recentes mostraram a ativação do tronco encefálico durante a antecipação da dor e as diferenças na ativação cortical entre estados sintomáticos e assintomáticos em pacientes com SDRC reversível^{272,273}. Além disso, tem sido demonstrado por meio de estudos com ressonância funcional magnética que pacientes com SDRC diferem de indivíduos saudáveis pelo padrão de ativação de áreas encefálicas que possuem vias de supressão da dor descendente opioidérgicas, como a PAG e o córtex cingulado que são ativados significativamente menos durante a supressão da dor, independentemente de serem estimulados na mão sintomática ou assintomática. Isso sugere que há uma mudança funcional generalizada em pacientes com SDRC²⁷⁴.

Assim, um outro importante sítio de modulação da dor analisado no presente estudo foi o tronco encefálico. Os resultados do presente estudo também demonstraram que a IR da pata induziu maiores concentrações de TNF- α e IL-6 no tronco encefálico paralelamente ao desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia mecânica nestes animais. E os grupos de animais que realizaram os protocolos de corrida contínua e intervalada apresentaram menores concentrações de TNF- α e IL-6 e maior concentração de IL-10 no tronco encefálico, juntamente como a redução da hiperalgesia mecânica. Em linha com estes resultados, Chamaa et al.²⁷⁵ analisaram o tronco encefálico de ratos

submetidos a dois modelos de lesão traumática do nervo isquiático (transecção e constrição crônica) e verificaram aumentadas concentrações de TNF- α e IL-1 β no tronco encefálico desses animais ainda no sétimo dia. Ainda de acordo com os achados do presente trabalho, estudo prévio com o modelo de dor neuropática, mas com diferente etiologia (esmagamento) mostrou que camundongos submetidos à lesão nervosa apresentaram maiores concentrações de TNF- α e IL-1 β no tronco encefálicos no décimo quarto dia após o esmagamento. E interessante, o tratamento dos animais com corrida contínua de baixa intensidade foi capaz de induzir à uma menor concentração de TNF- α e IL-1 β no tronco encefálicos desses animais.

5.8 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NO ESTADO REDOX NO TRONCO ENCEFÁLICO

Na análise do estresse oxidativo foi encontrado que a IR induziu uma diminuição no dano a lipídeos e aumentou o dano a proteínas. A atividade da enzima catalase no tronco encefálico apresentou-se aumentada, não alterando a atividade da SOD. Os valores dos equivalentes de MDA no grupo corrida intervalada aumentaram em relação ao controle, mas permaneceram semelhantes ao valor do grupo naive. Intrigantemente, a corrida intervalada apresentou menor dano a proteínas e aumento da atividade da enzima catalase. O grupo que realizou corrida contínua aumentou apenas a atividade da enzima SOD. Em um estudo prévio, Scheid et al.²⁷⁶ encontraram no tronco encefálico dano a lipídeos (dia 3) e da atividade da enzima SOD (dia 3 e 7) aumentados após transecção do nervo isquiático de ratos. Em relação aos efeitos do exercício no tronco encefálico, Souza et al.²⁷⁷ submeteram ratos hipertensos a um protocolo de natação por quatro semanas e constaram que o EF diminuiu a peroxidação lipídica e aumentou a atividade das enzimas SOD e catalase no tronco encefálico.

5.9 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA NAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA MEDULA ESPINAL

Na análise da medula espinal - um dos principais sítios de modulação da dor - se observou que a IR da pata produziu maiores concentrações de IL-1 β

concomitantemente com o desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia mecânica nestes animais. E os grupos de animais que realizaram os protocolos de corrida contínua e intervalada apresentaram menores concentrações de TNF- α e IL-6 e maior concentração de IL-10 na medula espinal, juntamente como a redução da hiperalgesia mecânica. Esses achados estão de acordo com dados da literatura, como o estudo de Bobinski et al.¹⁸⁷ que demonstrou que a corrida contínua realizada por 30 min, durante duas semanas reduziu as concentrações de TNF- α e IL-1 β na medula espinal, mas não alterou a concentração da IL-10 em um modelo traumático de neuropatia induzida por esmagamento do nervo isquiático em camundongos. No entanto, Gong et al.²⁷⁸ demonstrou em ratos com lesão nervosa infante (transecção) que a corrida contínua na esteira por três semanas reduziu a dor neuropática por aumentar a IL-10 na medula espinal. A redução da concentração de IL-6 também foi observada no estudo de Chen et al.²⁷⁷ onde submetem ratos a corrida contínua na esteira por 60 min, durante quatro semanas, porém em um modelo animal de dor pós-operatória.

Interessantemente, tem sido demonstrado que a IR da pata de ratos induz, no segundo dia, um aumento de NF κ B no músculo da pata e na medula espinal. No entanto, no sétimo dia os níveis de NF κ B musculares se normalizaram ao passo que na medula espinal ainda estava aumentado.¹² Mediadores inflamatórios incluindo TNF- α , IL-1 β , e IL-6 tem sido encontrado na medula espinal e no líquido cérebro-espinal de pacientes com SDRC-I podendo ativar ou serem ativados pelo NF κ B^{122,123,124}. Em camundongos, Tian et al.²⁸⁰ mostraram que o astrócito espinal é a principal célula glial envolvida na hiperalgesia mecânica induzida pela IR da pata de camundongos no terceiro dia após o procedimento. Os astrócitos tornam-se ativados em resposta ao mesmo estímulo capaz de ativar a microglia ou por produtos liberados pela microglia ativada¹¹⁷. Tem sido demonstrado que nas lesões nervosas, ocorre uma ativação precoce de células microglias seguida por uma ativação tardia de células astrocíticas¹¹⁸. Além disso, vários autores têm descrito que a microglia pode ser responsável por iniciar a hipersensibilidade dolorosa induzida por lesão nervosa periférica, e os astrócitos estão envolvidos no processo de manutenção desta alteração sensorial^{119,120}.

Alguns estudos têm encontrado um aumento da regulação de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com SDR. Em amostras de sangue e fluido cefalorraquidiano de pacientes com SDR, bradicinina e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IL-1 β , e IL-6) estavam aumentados, ao passo que os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) estavam diminuídas¹²².

5.10 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA SOBRE O ESTADO REDOX NA MEDULA ESPINAL

Além disso, na análise do estado de estresse oxidativo foi encontrado que a IR induziu uma diminuição na atividade da enzima SOD na medula espinal. Ambos protocolos de corrida reduziram o dano oxidativo, a corrida contínua por reduzir dano a lipídeos e a corrida intervalada por reduzir dano a proteínas. A atividade da enzima catalase permaneceu inalterada. Intrigantemente, os achados do presente estudo apontam poucas evidências para se sugerir um papel do estresse oxidativo espinal como mediador da hiperalgesia mecânica no décimo primeiro dia após IR. Estes dados corroboram parcialmente com literatura, uma vez que Pathak et al.²⁶⁰ encontraram no modelo de dor neuropática induzida pela CCI, um aumento do dano oxidativo (lipídeos e proteínas) e diminuição da defesa antioxidante (SOD e catalase) na medula espinal. Em ratos, Klafke et al.⁴⁶ verificaram que a IR da pata induziu dano a proteínas na medula espinal no décimo quarto dia após o procedimento. Apesar da literatura ser vasta em análises do estado redox no plasma, não se encontrou estudos que mostrasse a influência da corrida na esteira sobre o estado redox na medula espinal.

Estudos indicam que as EROs também estão envolvidas na dor neuropática por meio de um mecanismo que envolve células da medula espinal^{97,276,281}. Nas neuropatias, há um aumento na geração de EROs na medula espinal, acompanhada de uma redução na atividade da enzima SOD¹¹. Além disso, o aumento na produção de EROs mitocondrial em neurônios do CPME no modelo de ligadura do nervo espinal também tem sido observado⁹⁷. Estes achados mostram o papel das EROs na medula espinal, na geração e manutenção da dor crônica persistente após a lesão nervosa inflamatória ou isquêmica. Neste sentido, tem sido sugerido que o mecanismo subjacente ao

desenvolvimento da alodinia observado no modelo de DPIC, pode ser resultado do aumento de EROs na medula espinal pelo aumento da fosforilação do receptor NMDA induzindo a sensibilização central. Estudos^{98,99} que analisaram o nível de atividade de receptores NMDA na medula espinal e o efeito da suplementação exógena de antioxidantes em ratos com DPIC suportam esta hipótese.

Klafke et al.⁴⁶ avançaram no conhecido, pois além de mostrar na fase neuropática (14 dias após IR) o aumento do estresse oxidativo na medula espinal e hiperalgesia, eles demonstraram que o bloqueio de TRPA1 - um sensor para compostos oxidantes, como o peróxido de hidrogênio - reduziu marcadamente a dor crônica induzida por IR e ainda detectaram aumento nas concentrações de 4-HNE (um agonista TRPA1) na medula espinal após a indução de DPIC.

O exercício regular produz efeitos sistêmicos benéficos, incluindo a promoção da função cerebral. A resposta adaptativa ao exercício regular envolve a regulação do sistema antioxidante enzimático e a modulação do dano oxidativo. O exercício também exerce grande influência sobre o sistema imunológico interferindo na produção de citocinas²⁸². Além disso, o exercício tem um papel pré-condicionador dependendo da região do SNC avaliada²⁸³, modalidade (voluntária ou forçada) e intensidade (protocolos de baixa a alta intensidade)²⁸⁴.

Durante o EF, EROs são produzidas continuamente pelo metabolismo mitocondrial. As EROs estão associadas à sinalização redox positiva, mas concentrações elevadas podem aumentar o dano oxidativo e a disfunção encefálica²⁸³. No entanto, as EROs gerados pelo exercício moderado modulam a função no eixo do processamento da dor (medula espinal, tronco encefálico e CPF)²⁷⁷, aumentando a expressão de proteínas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas)²¹⁵.

5.11 TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

O exercício de alta intensidade está relacionado à uma aumentada produção de EROs mostrando impactos negativos no SNC, como aumento da lipoperoxidação, disfunção mitocondrial, redução de BDNF entre outros²⁸⁵. Entre

os protocolos de exercício de alta intensidade, o HIIT é caracterizado por episódios breves e repetidos de atividade vigorosa e seguidos por períodos de descanso ou exercício de baixa intensidade^{286,287}, tem sido recentemente associado a adaptações cardiovasculares²⁸ e metabólicas²⁹, mas poucos pesquisadores investigaram os efeitos no processamento da dor crônica^{30,31}. Neste sentido, e corroborando com os dados do presente estudo, Freitas et al.²⁸⁸ estudaram os efeitos de um programa de HIIT em longo prazo, analisando o estado redox (dano e defesa antioxidante) e mediadores neuroimune (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e a concentração de BDNF no hipocampo em ratos. Os autores observaram que o HIIT realizado por seis semanas diminuiu o dano oxidativo e aumentou atividade enzimática no hipocampo. O HIIT também induziu uma redução nas concentrações das citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e aumento na concentração de BDNF.

Poucos estudos, tem investigado os efeitos do HIIT na dor. Contudo estudos clínicos mostram as primeiras evidências que justificam o emprego desta modalidade de exercício no tratamento da dor, bem como o aprofundamento no seu mecanismo de ação. Astorino et al.²⁸⁹ demonstraram em homens e mulheres com similares níveis de atividade física que seis dias de HIIT reduziu a dor muscular na perna dos indivíduos. O'Leary et al.³⁰ compararam o HIIT ao treinamento contínuo de intensidade moderada e concluiu que HIIT é efetivo em aumentar a tolerância a dor muscular em indivíduos saudáveis.

5.12 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA SOBRE A EXPRESSÃO DE P-ERK1/2 E P-AKT1/2/3 FOSFORILADAS NA MEDULA ESPINAL

Após se analisar o papel das citocinas inflamatórias e o estresse oxidativo na fisiopatologia da DPIC, bem como o efeito do EF, o passo seguinte do presente estudo foi investigar o envolvimento de algumas enzimas efetoras intracelulares com papel na sensibilização central. A hipótese da ativação dessas proteínas no modelo da DPIC, se deu pela capacidade das EROs (que são produzidas pela IR da pata) de ativar ERK²⁹⁰ e Akt²⁹¹ em modelos de dor neuropática.

Há acumuladas evidências mostrando o papel crítico das EROs na fisiopatologia do SDRC-I. Além disso, tem sido demonstrado que sensibilização

central gerada a partir de disfunção do tecido periférico pode contribuir para a indução e persistência da dor neuropática, como SDRC-I⁴⁰. Dentre os vários mediadores já descritos, as EROs parecem participar de maneira efetiva na sensibilização central, uma vez que na dor neuropática existe uma redução na atividade antioxidante na medula espinal, como demonstrado por Guedes et al.¹¹. Neste cenário, a fosforilação do receptor de NMDA desempenha um papel importante na sensibilização central que ocorre CPME⁸⁹. Interessantemente, a ERK é necessária para a fosforilação induzida por estimulação nociva da subunidade NR1²⁹². Em particular, a ativação de ERK nos neurônios do corno posterior da medula espinal pela atividade nociceptiva, através de múltiplos receptores, e usando diferentes vias de segundo mensageiro desempenha um papel crítico na sensibilização central, regulando a atividade dos receptores para glutamato e canais de potássio e induzindo transcrição de genes¹⁰⁰.

Recentemente, Zhuang et al.¹²⁰ demonstraram que a ativação de ERK1/2 apresentou um padrão temporal em neurônios, microglia e astrócitos no CPME ipsilateral após a ligadura do nervo espinal. Os autores ainda demonstraram que a administração i.t. do inibidor da ERK1/2 reduziu a hiperalgesia mecânica. Park et al.⁹⁹ observaram, no modelo animal de DPIC, que ratos apresentaram maiores concentrações de ERK e da subunidade NR1 fosforiladas no terceiro dia após IR da pata.

A fim de, ampliar o conhecimento sobre a fisiopatologia da SDRC-I, o presente estudo investigou as concentrações de ERK fosforilada na medula espinal no décimo primeiro dia após a IR da pata de camundongos e o efeito do EF sobre ela. Os resultados do presente estudo, demonstraram os animais com IR da pata não apresentaram maiores concentrações de ERK fosforilada na medula espinal do que os animais naives no período avaliado. No entanto, os animais do grupo corrida intervalada apresentaram concentrações menores de ERK fosforilada na medula espinal. Acredita que este achado possa estar relacionado ao efeito anti-hiperalgésico induzido pela corrida intervalada.

Assim, se perguntou como o EF poderia inibir esta MAPK? A inibição de ERK induzida pela corrida intervalada pode ser um efeito mediado por molécula sinalizadoras liberadas pelo EF já bem conhecidas, como adenosina, canabinoides e opioides^{23,243,293,294}. Neste sentido, tem sido demonstrado que ativação do receptor para adenosina A₁ produz efeito anti-nociceptivo por inibir

a fosforilação de ERK²⁹⁵. Martins et al.²³ demonstraram o envolvimento do receptor A₁ no efeito anti-hiperalgésico da natação no modelo da DPIC, por prevenir o efeito da natação com o pré-tratamento dos animais com o antagonista do receptor A₁.

Além disso, a natação também inibe a nocicepção induzida pelo glutamato²⁹⁴ e a corrida na esteira reduz a fosforilação da subunidade NR1 na medula espinal²⁷⁹, sugerindo a inibição do sistema glutamatérgico (sensibilização central) na analgesia induzida pelo exercício. A inibição de PKA também foi encontrada paralelamente ao efeito anti-nociceptivo do exercício²⁹⁴. Essa evidência é interessante, uma vez que tem sido descrito que ativação de PKA induz a fosforilação de ERK em neurônios das lâminas superficiais na medula espinal²⁹⁶. Assim, a redução da concentração de ERK1/2 fosforilada na medula espinal induzida pela corrida intervalada, mas não pela corrida contínua no décimo primeiro dia em animais com DPIC, parece ser mais um efeito protocolo dependente.

Ainda, na dor neuropática tem sido descrito que ativação de Akt após transecção do nervo isquiático pode ser devido a sinalização originada de segundos mensageiros como o peróxido de hidrogênio e o 4-HNE onde estes sinais nos neurônios sensoriais leva a estimulação da expressão de genes relacionados a função nociceptiva²⁹¹.

No presente estudo, com análise da concentração de Akt1/2/3 fosforilada realizada no décimo primeiro dia de DPIC, não foi encontrado diferença entre os grupos estudados, levando a conclusão de que nem o procedimento de IR quanto a corrida interferem na expressão de Akt1/2/3 fosforilada e que a função desta enzima não está relacionada como a hiperalgesia mecânica observada neste modelo. Corroborando com esse achado, Guedes et al.²⁹¹ também não encontraram alterações nas concentrações de Akt fosforilada na medula espinal em um modelo de dor neuropática induzida pela transecção do nervo isquiático no décimo quarto dia, porém eles detectaram aumento desta enzima somente até o sétimo dia após lesão nervosa.

5.13 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDES SISTÊMICOS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELOS PROTOCOLOS DE CORRIDA CONTÍNUA E INTERVALADA

Nas últimas décadas o efeito analgésico causado pelo EF tem sido atribuído principalmente ao sistema opioide^{243,297}. Neste sentido, aqui também se investigou o envolvimento do sistema opioide no efeito anti-hiperalgésico dos dois protocolos de corrida. Os resultados mostraram que a naloxona na mesma dose que preveniu o efeito anti-hiperalgésico da morfina, também preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido pela corrida contínua e que a mesma dose ou uma dose dez vezes maior de naloxona não foram capazes de prevenir o efeito anti-hiperalgésico da corrida intervalada.

Esses achados, mais uma vez sugerem que a corrida intervalada produz efeito anti-hiperalgésico por vias diferentes da corrida contínua e de maneira não opioide. Estes resultados são consistentes com outros estudos que utilizaram doses diferentes de naloxona (1, 5, 10, 20 mg/kg), tanto em roedores quanto em humanos treinados através de exercícios intervalados, e também não observaram reversão do efeito antinociceptivo¹²⁹.

Corroborando com esses achados, Galdino et al.²⁹⁸ também administraram naloxona (5 mg/kg, i.p.) em diferentes grupos de animais submetidos a diferentes protocolos de EF aeróbico, mas com a mesma intensidade e não observaram prevenção do efeito anti-hiperalgésico induzido pelo EF.

Mais recentemente estudos vem demonstrando um importante papel de sistemas não opioide tais como, canabinoidérgico²⁹⁸, adenosinérgicos²³, serotoninérgico¹⁹², noradrenérgico²⁷⁷ e nitrérgico²⁹⁹ na analgesia induzida pelo EF.

Koltyn et al.¹²⁹ sugerem que o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo EF pode ser uma forma de adaptação de curto prazo à dor, que também pode ocorrer como resultado da exposição sistemática a períodos de dor intensa, mas limitada. As características desta adaptação indicam um possível papel do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal. Esta hipótese tem sido fortalecida pela demonstração de que o efeito anti-hiperalgésico induzido pela natação de alta intensidade pode ser prevenido pela adrenalectomia de camundongos²⁴¹.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados aqui, conclui-se:

- 1) O efeito anti-hiperalgésico produzido pela corrida contínua em esteira rolante parece ser tempo (volume) e velocidade (intensidade) dependentes, sendo que os maiores tempos e velocidades de corrida apresentaram os melhores efeitos;
- 2) O efeito anti-hiperalgésico produzido pela corrida contínua não depende da frequência semanal;
- 3) O aumento semanal da intensidade da corrida é fundamental para manter o efeito anti-hiperalgésico produzido pelas corridas contínua e intervalada;
- 4) O efeito anti-hiperalgésico da corrida intervalada com aumento da intensidade semanal, no início de cada semana foi mais duradouro (5 vezes mais) do que a corrida contínua. Porém, no final de cada semana os efeitos foram similares.
- 5) A corrida contínua e corrida intervalada se enquadraram no domínio moderado e pesado, respectivamente. Somente na corrida intervalada os valores da concentração de lactato sanguíneo voltaram aos valores basais, enquanto que no grupo corrida contínua os valores permaneceram elevados.
- 6) Embora o procedimento de IR da pata não alterou as concentrações das citocinas inflamatórias no CPF no 11º dia após lesão isquêmica, somente a corrida intervalada diminuiu as concentrações de TNF- α e IL-6, e aumentou as concentrações da IL-10.
- 7) Após 11 dias do procedimento de IR da pata houve aumento no dano a lipídeos e a atividade da enzima catalase, mas não alterações nas

concentrações de proteínas carboniladas e por outro lado houve uma diminuição da atividade da enzima SOD no CPF. A corrida contínua (após 5 dias de treinamento) diminuiu o dano à lipídeos, mas aumentou o dano a proteínas. A corrida intervalada somente diminuiu o dano a lipídeos. A atividade da enzima SOD apresentou-se aumentada nos dois protocolos de corrida.

- 8) No tronco encefálico, o procedimento de IR da pata após 11 dias induziu maiores concentrações de TNF- α e IL-6. Já os grupos exercitados apresentaram menores concentrações de TNF- α e IL-6 e maior concentração de IL-10, juntamente como a redução da hiperalgesia mecânica.
- 9) Ainda no tronco encefálico, a IR da pata no 11º dia após procedimento, induziu diminuição no dano a lipídeos e aumento no dano a proteínas. A atividade da enzima catalase no tronco encefálico apresentou-se aumentada, não alterando a atividade da SOD. Os valores dos equivalentes de MDA no grupo corrida intervalada aumentaram em relação ao controle, mas permaneceram semelhantes ao valor do grupo naive. A corrida intervalada apresentou menor dano a proteínas e aumento da atividade da enzima catalase. O grupo que realizou corrida contínua aumentou apenas a atividade da enzima SOD.
- 10) Na medula espinal, no 11º dia após a IR da pata houve aumento nas concentrações de IL-1 β . Os grupos de animais que realizaram os protocolos de corrida contínua e intervalada (após 5 dias de treinamento) apresentaram menores concentrações de TNF- α e IL-6 e maior concentração de IL-10.
- 11) Ainda na medula espinal, no 11º dia após a IR da pata houve diminuição na atividade da enzima SOD. Ambos protocolos de corrida reduziram o dano oxidativo, a corrida contínua por reduzir

dano a lipídeos e a corrida intervalada por reduzir dano a proteínas. A atividade da enzima catalase permaneceu inalterada.

- 12) Apesar do procedimento de IR da pata não alterar as concentrações de ERK1/2 fosforilada na medula espinal no 11º dia após a IR da pata. Os animais que realizaram corrida intervalada (após 5 dias de treinamento) apresentaram concentrações menores de ERK1/2 fosforilada.
- 13) As concentrações da Akt1/2/3 fosforilada na medula espinal não foram alteradas pelo procedimento de IR da pata, nem pelas corridas. Assim, sugere-se que a função desta enzima não está relacionada como a hiperalgesia mecânica observada neste modelo.
- 14) Os receptores opioides parecem mediar o efeito anti-hiperalgésico induzido pela corrida contínua. No entanto, eles não estão envolvidos no efeito anti-hiperalgésico induzido pela corrida intervalada.

Finalmente, a principal contribuição deste trabalho foi a determinação, pela primeira vez na literatura, dos melhores parâmetros de prescrição de exercício (duração, intensidade e frequência semanal) na redução da DPIC em camundongos. Secundariamente, mostrou-se as alterações inflamatória e oxidativas a nível do SNC na fase crônica da SDRC-I, sugerindo mecanismos que podem sustentar a hiperalgesia mecânica nesta fase e que pode ser um potencial alvo terapêutico. Por fim, demonstrou-se que a corrida intervalada apresenta grande potencial analgésico, com resultados mais promissores do que a corrida contínua. Isso pode ser explicado pelo fato da corrida intervalada ativar diferentes mecanismos daqueles ativadas pela corrida contínua. Assim, a corrida intervalada surge como uma alternativa importante para a prescrição de tratamentos adjuvantes em outros modelos animais e/ou em pacientes com dores crônicas.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas desse trabalho, pretende-se ainda:

- Aprofundar o estudo do mecanismo neurobiológico do efeito anti-hiperalgésico da corrida intervalada.
- Comparar o efeito anti-hiperalgésico da corrida intervalada versus contínua com diferentes volumes.
- Aplicar o protocolo de corrida intervalada em outros modelos de dor neuropática, com o objetivo de confirmar o efeito duradouro nas neuropatias.
- Em estudos translacionais, verificar em seres humanos os efeitos analgésicos do exercício contínuo versus intervalado em pacientes com dor crônica em solo e em ambiente aquático.

REFERÊNCIAS

1. Gay A, Parratte S, Salazard B, Guinard D, Pham T, Legré R, et al. Proprioceptive feedback enhancement induced by vibratory stimulation in complex regional pain syndrome type I: an open comparative pilot study in 11 patients. *Joint Bone Spine*. 2007;74 :461-6.
2. Coderre TJ. Complex regional pain syndrome: what's in a name? *J Pain*. 2011;12:2-12.
3. Choi YS, Lee MG, Lee HM, Lee CJ, Jo JY, Jeon SY, et al. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 150 Korean patients. *J Korean Med Sci* 2008; 23:772–5.
4. Bussan M, Mascaro A, Cuffaro L, Rinaldi S. Adult Complex Regional Pain Syndrome Type I: A Narrative Review. *PM R*. 2017;9(7):707-719.
5. Oyen WJ, Arntz IE, Claessens RM, Van der Meer JW, Corstens FH, Goris RJ. Reflex sympathetic dystrophy of the hand: an excessive inflammatory response? *Pain*. 1993; 55(2):151–7.
6. de Mos M, de Bruijn AG, Huygen FJ, Dieleman JP, Stricker BH, Sturkenboom MC. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. *Pain*. 2007;129(1-2):12-20.
7. Jellad A, Salah S, Ben S, Frih Z. Complex regional pain syndrome type I: incidence and risk factors in patients with fracture of the distal radius. *Arch Phys Med Rehabil*. 2014;95(3):487-92.
8. Roh YH, Lee BK, Noh JH, Baek JR, Oh JH, Gong HS, Baek GH. Factors associated with complex regional pain syndrome type I in patients with surgically treated distal radius fracture. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2014 ;134(12):1775-81.
9. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma XL. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J*. 1991; 5:2029-34.
10. Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation*. 2003; 108:2911–7.
11. Guedes RP, Bosco LD, Teixeira CM, Araújo AS, Llesuy S, Belló-Klein A, et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochem Res*. 2006; 31: 603-9.
12. Laferrière A, Millecamps M, Xanthos DN, Xiao WH, Siau C, de Mos M et al. Cutaneous tactile allodynia associated with microvascular dysfunction in muscle. *Mol Pain*. 2008;4:49.

13. de Mos M, Laferrière A, Millecamps M, Pilkington M, Sturkenboom MC, Huygen FJ, et al. Role of NFKappaB in an animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I). *J Pain*. 2009;10(11):1161–9.
14. Kramer HH, Eberle T, Üçeyler N, et al. TNF-alpha in CRPS and “normal” trauma—Significant differences between tissue and serum. *Pain*. 2011;152:285–90.
15. Leung L, Cahill CM. TNF-alpha and neuropathic pain-a review. *J Neuroinflammation*. 2010;7:27.
16. Cunha TM, Verri WA, Valerio DA, et al. Role of cyto- kines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *Eur J Pain*. 2008;12:1059–68.
17. Yan SF, Tritto I, Pinsky D, Liao H, Huang J, Fuller G, et al. Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor- IL-6. *J Biol Chem*. 1995; 270(19):11463-71.
18. Laferrière A, Millecamps M, Xanthos DN, Xiao W-H, Bennett GJ, Coderre TJ. Chronic post- ischemia pain: A novel animal model suggests that ischemia-reperfusion (I-R) injury, no-reflow and chronic tissue ischemia contribute to CRPS-I. *Eur J Pain*. 2007;11:S61-2.
19. Naugle KM, Fillingim RB, Riley JL 3rd. A meta-analytic review of the hypoalgesic effects of exercise. *J Pain*. 2012;13(12):1139-50.
20. Safakhah HA, Moradi Kor N, Bazargani A, Bandegi AR, Gholami Pournadieh H, Khoshkholgh-Sima B, et al. Forced exercise attenuates neuropathic pain in chronic constriction injury of male rat: an investigation of oxidative stress and inflammation. *J Pain Res*. 2017;10:1457-1466.
21. 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.
22. Bobinski F, Teixeira JM, Sluka KA, Santos ARS. Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. *Pain*. 2017.
23. Martins DF, Mazzardo-Martins L, Soldi F, Stramosk J, Piovezan AP, Santos AR. High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. *Neuroscience*. 2013;234:69-76.
24. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008 ;44(2):153-9.
25. Radak Z, Taylor A W, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise- induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*. 2001;7:90-107.

26. Da Silva MD, Bobinski F, Sato KL, Kolker SJ, Sluka KA, Santos ARS. IL-10 cytokine released from M2 macrophages is crucial for analgesic and anti-inflammatory effects of acupuncture in a model of inflammatory muscle pain. *Mol Neurobiol.* 2015 ;51(1):19-31.
27. Kravitz L. High-Intensity Interval Training. ACSM [Internet] 2014. Acesso em 01/12/2017. Disponível em: <https://www.acsm.org/docs/brochures/high-intensity-interval-training.pdf>
28. Munk PS, Butt N, Larsen AI. High-intensity interval exercise training improves heart rate variability in patients following percutaneous coronary intervention for angina pectoris. *Int J Cardiol.* 2010;145(2):312-4.
29. Mangiamarchi P, Caniuqueo A, Ramírez-Campillo R, Cárdenas P, Morales S, Cano-Montoya J, et al. Effects of high-intensity interval training and nutritional education in patients with type 2 diabetes. *Rev Med Chil.* 2017;145(7):845-853.
30. O'Leary TJ, Collett J, Howells K, Morris MG. High but not moderate-intensity endurance training increases pain tolerance: a randomised trial. *Eur J Appl Physiol.* 2017;117(11):2201-2210.
31. Sandstad J, Stensvold D, Hoff M, Nes BM, Arbo I, Bye A. The effects of high intensity interval training in women with rheumatic disease: a pilot study. *Eur J Appl Physiol.* 2015;115(10):2081-9.
32. Wasner G, Backonja MM, Baron R. Traumatic neuralgias: complex regional pain syndromes (reflex sympathetic dystrophy and causalgia): clinical characteristics, pathophysiological mechanisms and therapy. *Neurol Clin.* 1998;16:851-68.
33. Marinus J, Van Hilten JJ. Clinical expression profiles of complex regional pain syndrome, fibromyalgia and a-specific repetitive strain injury: more common denominators than pain? *Disabil Rehabil.* 2006;28:351-62.
34. Samma AS, Filén T, Johansson M, Sandström S, Stiewe G, Butler S. Mirror therapy for Complex Regional Pain Syndrome (CRPS)- A literature review and an illustrative case report. *Scandinavian Journal of Pain.* 2013;4:200-207
35. Li Z, Smith BP, Smith TL, Koman LA. Diagnosis and management of complex regional pain syndrome complicating upper extremity recovery. *J Hand Ther.* 2005;18:270-6.
36. Schwarzer A, Maier C. Complex Regional Pain Syndrome. In: Kopf A, Patel NB, editors. *Guide to pain management in low resource settings.* Seattle: IASP; 2010. P. 249-254.
37. Gierthmuhlen J, Binder A, Baron R. Mechanism-based treatment in complex regional pain syndromes. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(9): 518– 528.

38. Grothusen JR, Alexander G, Erwin K, Schwartzman R. Thermal pain in complex regional pain syndrome type I. *Pain Physician*. 2014;17:71–79.
39. Gay AM, Béréni N, Legré R. Type I complex regional pain syndrome. *Chir Main*. 2013;32(5):269-80.
40. Bruehl S. An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology*. 2010;113(3):713-25.
41. Kingery WS, Guo T, Agashe GS, Davies MF, Clark JD, Maze M. et al. Glucocorticoid inhibition of neuropathic limb edema and cutaneous neurogenic extravasation. *Brain Res*. 2001; 913(2):140-148.
42. Coderre TJ, Xanthos DN, Francis L, Bennett GJ. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain*. 2004;112(1-2):94-105
43. Guo TZ, Wei T, Shi X, Li WW, Hou S, Wang L, et al. Neuropeptide deficient mice have attenuated nociceptive, vascular, and inflammatory changes in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome. *Mol Pain*. 2012;8:85.
44. Terkelsen AJ, Bach FW, Jensen TS. Experimental forearm immobilization in humans induces cold and mechanical hyperalgesia. *Anesthesiology*. 2008;109(2): 297-307
45. Tajerian M, Clark JD. New Concepts in Complex Regional Pain Syndrome. *Hand Clin*. 2016;32(1):41-9.
46. Klafke JZ, da Silva MA, Rossato MF, de Prá SD, Rigo FK, Walker CI, et al. Acute and chronic nociceptive phases observed in a rat hind paw ischemia/reperfusion model depend on different mechanisms. *Pflugers Arch*. 2016;468(2):229-41.
47. Li WW, Guo TZ, Shi X, Czirr E, Stan T, Sahbaie P, et al. Autoimmunity contributes to nociceptive sensitization in a mouse model of complex regional pain syndrome. *Pain*. 2014;155(11):2377-89.
48. Birklein F, Drummond PD, Li W, Schlereth T, Albrecht N, Finch PM, et al. Activation of cutaneous immune responses in complex regional pain syndrome. *J Pain*. 2014;15(5):485-95.
49. Huygen FJ, Ramdhani N, van Toorenenbergen A, Klein J, Zijlstra FJ. Mast cells are involved in inflammatory reactions during complex regional pain syndrome type 1. *Immunol Lett*. 2004; 91(2-23):147-154.
50. Leis S, Weber M, Isselmann A, Schmelz M, Birklein F. Substance-P-induced protein extravasation is bilaterally increased in complex regional pain syndrome. *Exp Neurol*. 2003;183(1):197-204.

51. Weber M, Birklein F, Neundorfer B, Schmelz M. Facilitated neurogenic inflammation in complex regional pain syndrome. *Pain*. 2001;91(3):251-7
52. Schilder JC, Schouten AC, Perez RS, Huygen FJ, Dahan A, Noldus LP, et al. Motor control in complex regional pain syndrome: a kinematic analysis. *Pain*. 2012;153(4):805-12.
53. Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett*. 2008;437(3):199-202.
54. Goebel A, Blaes F. Complex regional pain syndrome, prototype of a novel kind of autoimmune disease. *Autoimmun Rev*. 2013;12(6):682-6.
55. Birklein F, Weber M, Neundorfer B. Increased skin lactate in complex regional pain syndrome: evidence for tissue hypoxia? *Neurology*. 2000; 55:1213-5.
56. Alexander GM, Perreault MJ, Reichenberger ER, Schwartzman RJ. Changes in immune and glial markers in the CSF of patients with Complex Regional Pain Syndrome. *Brain Behav Immun*. 2007;21:668-676.
57. Freund W, Wunderlich AP, Stuber G, Mayer F, Steffen P, Mentzel M, et al. The role of periaqueductal gray and cingulate cortex during suppression of pain in complex regional pain syndrome. *Clin J Pain*. 2011;27(9):796-804.
58. Rüegg S. Drug treatment of CRPS. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2010;42:19-29.
59. Knotkova H, Pappagallo M. Adjuvant analgesics. *Med Clin North Am*. 2007;91:113-24.
60. Taskaynatan MA, Ozgul A, Tan AK, Dincer K, Kalyon TA. Bier block with methylprednisolone and lidocaine in CRPS type I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *Reg Anesth Pain Med*. 2004;29(5):408-12.
61. Oerlemans HM, Oostendorp RA, de Boo T, Goris RJ. Pain and reduced mobility in complex regional pain syndrome I: outcome of a prospective randomised controlled clinical trial of adjuvant physical therapy versus occupational therapy. *Pain*. 1999;83:77-83.
62. Little RC, Ginsburg JM. The physiologic basis for clinical edema. *Arch Intern Med*. 1984; 144(8):1661-4.
63. Matsumura H, Jimbo Y, Watanabe K. Haemodynamic changes in early phase reflex sympathetic dystrophy. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1996; 30:133-8.
64. Schurmann M, Zaspel J, Grandl G, Wipfel A, Christ F. Assessment of the peripheral microcirculation using computer-assisted venous congestion

plethysmography in post-traumatic complex regional pain syndrome type I. *J Vasc Res.* 2001; 38:453-61.

65. Mubarak SJ, Pedowitz RA, Hargens AR. Compartment syndromes. *Curr Orthop.* 1989; 3:36-40.

66. Lyden SP, Shortell CK, Illig KA. Reperfusion and compartment syndromes: strategies for prevention and treatment. *Semin Vasc Surg.* 2001; 14:107-13.

67. Hargens AR, Mubarak SJ. Current concepts in the pathophysiology, evaluation, and diagnosis of compartment syndrome. *Hand Clin.* 1998; 14:371-83.

68. Fulkerson E, Razi A, Tejwani N. Review: acute compartment syndrome of the foot. *Foot Ankle Int.* 2003; 24(2):180-7.

69. Allen G, Galer BS, Schwartz L. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. *Pain.* 1999; 80:539-44.

70. Galer BS, Henderson J, Perander J, Jensen MP. Course of symptoms and quality of life measurement in Complex Regional Pain Syndrome: a pilot survey. *J Pain Symptom Manage.* 2000; 20:286-92.

71. van der Laan L, Goris RJ. Reflex sympathetic dystrophy after a burn injury. *Burns.* 1996; 22:303-6.

72. Miller SH, Price G, Buck D, Neeley J, Kennedy TJ, Graham WP 3rd, et al. Effects of tourniquet ischemia and postischemic edema on muscle metabolism. *J Hand Surg Am.* 1979;4(6):547-55.

73. Wakai A, Winter DC, Street JT, Redmond PH. Pneumatic tourniquets in extremity surgery. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001; 9:345-51.

74. Kellogg EW 3rd, Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxydase system. *J Biol Chem.* 1975; 250(22):8812-17.

75. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovascular Surgery.* 2002; 10(6):620-30.

76. Menger MD, Rücker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock.* 1997; 8(1):2-7.

77. Kennedy TJ, Miller SH, Nellis SH, Buck D, Flaim SF, Graham WP 3rd, et al. Effects of transient ischemia on nutrient flow and arteriovenous shunting in canine hindlimb. *Ann Surg.* 1981; 193(3):255-63.

78. Granger DN, Kvietys PR, Perry MA. Leucocyte-endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993; 71:67-75.
79. Lindsay TF, Hill J, Ortiz F, Rudolph A, Valeri CR, Hechtman HB, et al. Blockade of complement activation prevents local and pulmonary albumin leak after lower torso ischemia- reperfusion. *Ann Surg.* 1992; 216(6):677-83.
80. Lehr HA, Guhlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmet K. Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest.* 1991; 87(6):2036-41.
81. Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace JL, Granger DN. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol.* 1990; 259:G300-5.
82. Coderre TJ, Bennett GJ. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome-type I (reflex sympathetic dystrophy): pain due to deep-tissue microvascular pathology. *Pain Med.* 2010;11(8):1224-38.
83. Mense S. The pathogenesis of muscle pain. *Curr Pain Headache Rep.* 2003; 7:419-25.
84. Hagberg H. Intracellular pH during ischemia in skeletal muscle: relationship to membrane potential, extracellular pH, tissue lactic acid and ATP. *Pflugers Arch.* 1985; 404(4):342-347.
85. Watkins LR, Maier SF. Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain. *J Intern Med.* 2005;257(2):139-155.
86. Birklein F, Kunzel W, Sieweke N. Despite clinical similarities there are significant differences between acute limb trauma and complex regional pain syndrome I (CRPS I). *Pain.* 2001;93(2):165-71.
87. Schwartzman RJ, Kerrigan J. The movement disorder of reflex sympathetic dystrophy. *Neurology.* 1990;40(1):57-61.
88. van Hilten JJ, van de Beek WJ, Vein AA, van Dijk JG, Middelkoop HA. Clinical aspects of multifocal or generalized tonic dystonia in reflex sympathetic dystrophy. *Neurology.* 2001;56(12):1762-5.
89. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 2000;288(5472):1765-9.
90. Woolf CJ. A new strategy for the treatment of inflammatory pain. Prevention or elimination of central sensitization. *Drugs.* 1994;47(Suppl 5):1-9.

91. Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks TG, McCaigue MD, Leggett P, Halliday MI, et al. Lower limb ischaemia–reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function. *Br J Surg.* 1997;84: 1425-9.
92. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc.* 1987;46(7):2402-6.
93. Inauen W, Suzuki M, Granger DN. Mechanisms of cellular injury: potential sources of oxygen free radicals in ischemia/reperfusion. *Microcirc Endothelium Lymphatics.* 1989;5(3-5):143-55.
94. Partrick DA, Moore FA, Moore EE, Barnett Jr CC, Silliman CC. Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *New Horiz.* 1996;4(2):194-210.
95. Khalil Z, Khodr B. A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:430-9.
96. Khalil Z, Liu T, Helme RD. Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular responses and the maintenance of thermal hyper- algesia in rats with chronic constriction injury. *Pain.* 1999;79:31-7.
97. Park ES, Gao X, Chung JM, Chung K. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci Lett.* 2006; 391(3): 108-11.
98. Ryu TH, Jung KY, Ha MJ, Kwak KH, Lim DG, Hong JG. Superoxide and Nitric Oxide Involvement in Enhancing of N-methyl-D-aspartate Receptor-Mediated Central Sensitization in the Chronic Post-ischemia Pain Model. *Korean J Pain.* 2010;23(1):1-10.
99. Park JM, Kim CK, Lee HC, Jung H, Choi KU, Hong SW, et al. Antiallodynic effects of vitamin C and vitamin E in chronic post-ischemia pain rat model. *Korean J Anesthesiol.* 2013;65(5):442-8.
100. Ji RR, Gereau RW 4th, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev.* 2009;60(1):135-48.
101. Popiolek-Barczyk K, Mika J. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of Neuropathic Pain. *Curr Med Chem.* 2016;23(26):2908-2928.
102. Hay, N.; Sonenberg, N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.*, 2004, 18, 1926-1945.
103. Obara I, Tochiki KK, Géranton SM, Carr FB, Lumb BM, Liu Q, et al. Systemic inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway reduces neuropathic pain in mice. *Pain.* 2011;152: 2582-2595.

104. Pezet S, Marchand F, D'Mello R, Grist J, Clark AK, Malcangio M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is a key mediator of central sensitization in painful inflammatory conditions. *J. Neurosci.* 2008;28: 4261-4270.
105. Xu JT, Tu HY, Xin WJ, Liu XG, Zhang GH, Zhai CH. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Exp. Neurol.* 2007;206: 269-279.
106. Calder JS, Holten I, McAllister RM. Evidence for immune system involvement in reflex sympathetic dystrophy. *J. Hand Surg.* 1998;23,(2):147-150.
107. Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(7): 521–532.
108. Tsuda M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *J Diabetes Investig.* 2016;7(1):17-26.
109. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathologic pain. *Trends Neurosci.* 2001;24(8): 450–455.
110. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19:312-318.
111. Raghavendra V, Tanga F, Deleo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(2):624-30.
112. Bao L, Zhu Y, Elhassan AM, Wu Q, Xiao B, Zhu J, et al. Adjuvant-induced arthritis: IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha are up-regulated in the spinal cord. *Neuroreport.* 2001;12(18):3905-8.
113. Obata H, Eisenach JC, Hussain H, Bynum T, Vincler M. Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. *J Pain.* 2006;7(11):816-22.
114. Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, et al. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *The Journal of Neuroscience.* 2003; 23(3):1026-1040.
115. Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2006;26(16):4308-17.
116. Zhang RX, Liu B, Wang L, Ren K, Qiao JT, Berman BM, et al. Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia. *Pain.* 2005;118(1-2):125-36.
117. Dong YS, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia.* 2001;36(2):180-190.

118. Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF. Dissociation of Microglial Activation and Neuropathic Pain Behaviors Following Peripheral Nerve Injury in the Rat. *J Neuroimmunol.* 1997;79(2):163-75.
119. Rodriguez Parkitna J, Korostynski M, Kaminska-Chowaniec D, Obara I, Mika J, Przewlocka B, et al. Comparison of gene expression profiles in neuropathic and inflammatory pain. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57(3):401-14.
120. Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain.* 2005;114(1-2):149-59.
121. Alexander GM, van Rijn MA, van Hilten JJ, Perreault MJ, Schwartzman RJ. Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. *Pain.* 2005;116(3):213-9.
122. Blair SJ, Chinthagada M, Hoppenstehdt D, Kijowski R, Fareed J. Role of neuropeptides in pathogenesis of reflex sympathetic dystrophy. *Acta Orthop Belg.* 1998; 64:448 –51.
123. Jongeneel CV. Regulation of the TNF alpha gene. *Prog Clin Biol Res.* 1994;388:367-381.
124. Sehgal PB. Regulation of IL6 gene expression. *Res Immunol.* 1992;143:724-734.
125. American College of Sports Medicine, 2013. ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription. Williams, & Wilkins, Lippincott.
126. Albright A, Franz M, Hornsby G, Kriska A, Marrero D, Ullrich I, et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. *Sci Sports Exerc.* 2000;32(7):1345-60.
127. Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA. American college of sports medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2004;36(3):533-553.
128. Kushi LH, Byers T, Doyle C, Bandera EV, McCullough M, McTiernan A, et al. American cancer society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J. Clin.* 2006;56:254-281.
129. Koltyn KF. Analgesia following exercise: a review. *Sports Med* 2000; 29: 85-98
130. Tucker JM, Welk GJ, Beyler NK. Physical activity in U.S.: adults compliance with the Physical Activity Guidelines for Americans. *Am. J. Prev. Med.* 2011;40: 454-461.

131. Loustalot F, Carlson SA, Kruger J, Buchner DM, Fulton JE. Muscle-strengthening activities and participation among adults in the United States. *Res Q Exerc Sport*. 2013;84(1):30-8.
132. Anderson CB. When more is better: number of motives and reasons for quitting as correlates of physical activity in women. *Health Educ Res*. 2003;18(5):525-37.
133. Korkiakangas EE, Alahuhta MA, Husman PM, Keinänen-Kiukaanniemi S, Taanila AM, Laitinen JH. Motivators and barriers to exercise among adults with a high risk of type 2 diabetes-a qualitative study. *Scand J Caring Sci*. 2011;25(1):62-9.
134. Sandrow-Feinberg HR, Houlié JD. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation. *Brain Res*. 2015;4;1619:12-21.
135. Zapata-Lamana R, Cigarroa I, Díaz E, Saavedra C. Resistance exercise improves serum lipids in adult women. *Rev Med Chil*. 2015;143(3):289-96.
136. Rampazo-Lacativa MK, D'Elboux MJ. Effect of cycle ergometer and conventional exercises on rehabilitation of older patients with total hip arthroplasty: study protocol for randomized controlled trial. *Trials*. 2015;16:139.
137. Shephard RJ. Exercise physiology and performance of sport. *Sports Sciences*. 1992;1:1-12.
138. Hechanova RL, Wegler JL, Forest CP. Exercise: A vitally important prescription. *JAAPA*. 2017;30(4):17-22.
139. Wathan DBT, Earle RW. Human Kinetics; Champaign, IL: 2008. Periodization; in *Essentials of Strength and Conditioning*.
140. Strohacker K, Fazzino D, Breslin WL, Xu X. The use of periodization in exercise prescriptions for inactive adults: A systematic review. *Prev Med Rep*. 2015;2:385-96.
141. Kraemer WJ, Ratamess NA. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36:674-688.
142. Karvonen J, Vuorimaa T. Heart rate and exercise intensity during sports activities. Practical application. *Sports Med*. 1988;5(5):303-11.
143. Poole DC, Richardson RS. Determinants of oxygen uptake. Implications *Exerc. Test Sports Med*. 1997;24:308-320.
144. Billat LV. Use of blood lactate measurements for prediction of exercise performance and for control of training. Recommendations for long-distance running. *Sports Med*. 1996;22(3):157-75.

145. Astorino TA, Schubert MM. Changes in fat oxidation in response to various regimes of high intensity interval training (HIIT). *Eur J Appl Physiol*. 2018 Jan;118(1):51-63.

146. Boutcher YN, Hopp JP, Boutcher SH. Acute effect of a single bout of aerobic exercise on vascular and baroreflex function of young males with a family history of hypertension. *J Hum Hypertens*. 2011;25(5):311-9.

147. Gayda M, Juneau M, Nigam A. Comment on the paper by Gibala, Little, Macdonald and Hawley entitled physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol*. 2012;590(14):3389; author reply 3391.

148. Gibala MJ, Jones AM. Physiological and performance adaptations to high-intensity interval training. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2013;76:51-60.

149. Alves ED, Salermo GP, Panissa VLG, Franchini E, Takito MY. Effects of long or short duration stimulus during high-intensity interval training on physical performance, energy intake, and body composition. *J Exerc Rehabil*. 2017 Aug;13(4):393-399.

150. Suárez Rodríguez D, Del Valle Soto M. A study of intensity, fatigue and precision in two specific interval trainings in young tennis players: high-intensity interval training versus intermittent interval training. *BMJ Open Sport Exerc Med*. 2017; 3(1):e000250.

151. de Oliveira Sá G, Dos Santos Neves V, de Oliveira Fraga SR, Souza-Mello V, Barbosa-da-Silva S. High-intensity interval training has beneficial effects on cardiac remodeling through local renin-angiotensin system modulation in mice fed high-fat or high-fructose diets. *Life Sci*. 2017;189:8-17.

152. Wormgoor SG, Dalleck LC, Zinn C, Harris NK. Acute blood glucose, cardiovascular and exaggerated responses to high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training in men with type 2 diabetes mellitus. *J Sports Med Phys Fitness*. 2017.

153. Dias KA, Ingul CB, Tjønnha AE, Keating SE, Gomersall SR, Follestad T, et al. Effect of High-Intensity Interval Training on Fitness, Fat Mass and Cardiometabolic Biomarkers in Children with Obesity: A Randomised Controlled Trial. *Sports Med*. 2017.

154. Mijwel S, Backman M, Bolam KA, Jervaeus A, Sundberg CJ, Margolin S, et al. Adding high-intensity interval training to conventional training modalities: optimizing health-related outcomes during chemotherapy for breast cancer: the OptiTrain randomized controlled trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;14.

155. Andersen G, Heje K, Buch AE, Vissing J. High-intensity interval training in facioscapulohumeral muscular dystrophy type 1: a randomized clinical trial. *J Neurol*. 2017;264(6):1099-1106.

156. Thompson, WR. Worldwide survey of fitness trends for 2017. *ACSM's Health and Fitness Journal*. 2016;20(6):8-17.
157. Wewege M, van den Berg R, Ward RE, Keech A. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2017;18(6):635-646.
158. Green N, Wertz T, LaPorta Z, Mora A, Serbas J, Astorino TA. Comparison of Acute Physiological and Psychological Responses Between Moderate Intensity Continuous Exercise and three Regimes of High Intensity Training. *J Strength Cond Res*. 2017:19.
159. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exerc Sport Sci Rev*. 2008;36(2):58-63.
160. Cassidy S, Thoma C, Houghton D, Trenell MI. High-intensity interval training: a review of its impact on glucose control and cardiometabolic health. *Diabetologia*. 2017;60(1):7-23.
161. Weston M, Taylor KL, Batterham AM, Hopkins WG. Effects of Low-Volume High-Intensity Interval Training (HIT) on Fitness in Adults: A Meta-Analysis of Controlled and Non-Controlled Trials. *Sports Med*. 2014;44(7): 1005-1017.
162. Buchheit M, Laursen PB. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: cardiopulmonary emphasis. *Sports Med*. 2013;43(5):313-38.
163. Kriel Y, Kerhervé HA, Askew CD, Solomon C. The Effect of Active versus Passive Recovery Periods during High Intensity Intermittent Exercise on Local Tissue Oxygenation in 18 - 30 Year Old Sedentary Men. *PLoS One*. 2016 ;11(9):e0163733.
164. Stork MJ, Banfield LE, Gibala MJ, Martin Ginis KA. A scoping review of the psychological responses to interval exercise: is interval exercise a viable alternative to traditional exercise? *Health Psychol Rev*. 2017;11(4):324-344.
165. Borges JP, Masson GS, Tibiriçá E, Lessa MA. Aerobic Interval Exercise Training Induces Greater Reduction in Cardiac Workload in the Recovery Period in Rats. *Arq Bras Cardiol*. 2014;102(1):47-53.
166. Emamian ES. Akt/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2012;5:33.
167. Mazzardo-Martins L, Martins DF, Stramosk J, Cidral-Filho FJ, Santos AR. Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action. *Neuroscience*. 2012;226:411-420.

168. Goldfarb AH, Hatfield BD, Armstrong D, Potts J. Plasma beta-endorphin concentration: response to intensity and duration of exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1990;22:241-244.
169. Knauf MT, Koltyn KF. Exercise-induced modulation of pain in adults with and without painful diabetic neuropathy. *J Pain*. 2014;15(6):656-63.
170. Daenen L, Varkey E, Kellmann M, Nijs J. Exercise, not to exercise, or how to exercise in patients with chronic pain? Applying science to practice. *The Clinical Journal of Pain*. 2015;31:108-114.
171. Kroll HR. Exercise Therapy for Chronic Pain. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2015;26(2):263-28.
172. Thoren P, Floras JS, Hoffmann P, Seals DR. Endorphins and exercise: physiological mechanisms and clinical implications. *Med Sci Sports Exerc*. 1990;22:417-428.
173. Koltyn KF, Brellenthin AG, Cook DB, Sehgal N, Hillard C. Mechanisms of exercise-induced hypoalgesia. *J Pain*. 2014;15(12):1294-1304.
174. Cook DB, Koltyn KF. Pain and exercise. *Int J Sport Psychol*. 2000;31:256–277.
175. Dietrich A, McDaniel WF. Endocannabinoids and exercise. *Br J Sport Med*. 2004;38:536-541
176. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 1991;11:563–583.
177. Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 1998;83:393-411.
178. Walker JM, Hohmann AG. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):509-54.
179. Hohmann AG, Suplita RL. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J*. 2006;8:E693-E708.
180. Dishmann RK, O'Connor PJ. Lessons in exercise neurobiology: The case of endorphins. *Mental Health and Physical Activity*. 2009; 2:4-9.
181. Sawynok J. Adenosine receptor activation and nociception. *European Journal of Pharmacology*. 1998;317:1-11.
182. Koltyn KF. Exercise-induced hypoalgesia and intensity of exercise. *Sport Med*. 2002; 32:477-487.

183. O'Connor PJ, Cook DB. Exercise and pain: the neurobiology, measurement, and laboratory study of pain in relation to exercise in humans. *Exerc Sport Sci Rev.* 1999;27:119-166.
184. Hoffman MD, Shepanski MA, Ruble SB, Valic Z, Buckwalter JB, Clifford PS. Intensity and duration threshold for aerobic exercise-induced analgesia to pressure pain. *Arch Phys Med Rehabil.* 2004;85(7):1183–1187.
185. Naugle KM, Naugle KE, Fillingim RB, Samuels B, Riley JL 3rd. Intensity thresholds for aerobic exercise-induced hypoalgesia. *Med Sci Sports Exerc.* 2014;46(4):817-825.
186. Kodesh E, Weissman-Fogel I. Exercise induced hypoalgesia - interval versus continuous mode. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(7):829-34.
187. Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience.* 2011;194:337-48.
188. Chen YW, Li YT, Chen YC, Li ZY, Hung CH. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesth Analg.* 2012;114:1330-1337.
189. Korb A, Bonetti LV, da Silva SA, Marcuzzo S, Ilha J, Bertagnolli M, Partata WA, et al. Effect of treadmill exercise on serotonin immunoreactivity in medullary raphe nuclei and spinal cord following sciatic nerve transection in rats. *Neurochem Res.* 2010;35:380-389.
190. Grace PM, Fabisiak TJ, Green-Fulgham SM, Anderson ND, Strand KA, Kwilasz AJ, et al. Prior voluntary wheel running attenuates neuropathic pain. *Pain.* 2016;157(9):2012-23.
191. Kami K, Taguchi S, Tajima F, Senba E. Histone Acetylation in Microglia Contributes to Exercise-Induced Hypoalgesia in Neuropathic Pain Model Mice. *J Pain.* 2016;17(5):588-99.
192. 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):2595-2606.
193. Pervaiz N, Hoffman-Goetz L. Immune cell inflammatory cytokine responses differ between central and systemic compartments in response to acute exercise in mice. *Exerc Immunol Rev.* 2012;18:142-57.
194. Radak Z, Pucsok J, Mecseki S, Csont T, Ferdinandy P. Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:1059-1063.

195. Radak Z, Chung HY, Goto S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*. 2005;6:71-75.
196. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(10):1208-46.
197. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008; 88(4): 1243-1276.
198. Saborido A, Naudí A, Portero-Otín M, Pamplona R, Megías A. Stanozolol treatment decreases the mitochondrial ROS generation and oxidative stress induced by acute exercise in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2011;110(3):661-9.
199. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. 2010;45: 466-472.
200. Heath GW, Hagberg JM, Ehsani AA, Holloszy JO. A physiological comparison of young and older endurance athletes. *J Appl Physiol*. 1981;51:634-40.
201. Booth FW, Lees SJ. Fundamental questions about genes, inactivity, and chronic diseases. *Physiol Genom*. 2007; 28(2): 146-157.
202. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):126-31.
203. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Role of nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise-induced antioxidant enzyme adaptation. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32: 930-935.
204. Ji LL. Exercise and oxidative stress: Role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev*. 1995;23:135-166.
205. Reid MB. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*. 2001;90:724-731.
206. Higuchi M, Cartier LJ, Chen, M.; Holluszy JO. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: Adaptive response to exercise. *J Gerontol*. 1985;40:281-286.
207. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1994;266(2 Pt 2):R375-80.

208. Laughlin, MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR; Smith JK, Korthuis, RJ Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J. Appl. Physiol.* 1990; 68:2337–2343
209. Lawler JM, Powers SK, Visser, T, Van Dijk H, Kordus, MJ, Ji LL. Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effect of fiber type and age. *Am. J. Physiol.* 1993;265:1344–1350.
210. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sport Med.*1988; 5:156-170.
211. Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(2):142-52.
212. Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995;50(4):635-9.
213. Acikgoz O, Aksu I, Topcu A, Kayatekin BM. Acute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett.* 2006;406(1-2):148-51.
214. Cechetti F, Fochesatto C, Scopel D, Nardin P, Gonçalves CA, Netto CA, et al. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Res.* 2008;1188:182-8.
215. Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett.* 2009;452(3):281-5.
216. Sherry DD, Wallace CA, Kelley C, Kidder M, Sapp L. Short- and long-term outcomes of children with complex regional pain syndrome type I treated with exercise therapy. *Clin J Pain.* 1999;15(3):218-23.
217. Topcuoglu A, Gokkaya NK, Ucan H, Karakuş D. The effect of upper-extremity aerobic exercise on complex regional pain syndrome type I: a randomized controlled study on subacute stroke. *Top Stroke Rehabil.* 2015;22(4):253-61.
218. Thomas JR, Nelson JK, Silverman SJ. Métodos de pesquisa em atividade física. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 478 p.
219. Millecamps M, Laferrière A, Ragavendran JV, Stone LS, Coderre TJ. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). *Pain.* 2010;151(1):174-83.
220. Martins DF, Prado MR,, Daruge-Neto E, Batisti AP, Emer AA,, Mazzardo-Martins L, et al. Caffeine prevents antihyperalgesic effect of gabapentin in an animal model of CRPS-I: evidence for the involvement of spinal adenosine A1 receptor. *J Peripher Nerv Syst.* 2015;20(4):403-9.

221. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78.
222. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
223. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-5.
224. Boveris, A., and E. Cadenas 1982 Production of superoxide in mitochondria, in: L.W. Oberley (Ed.), *Superoxide Dismutase*, il, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 15-30.
225. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry.* 1976 72, 248-254
226. 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.
227. Kim YJ, Byun JH, Choi IS. Effect of Exercise on μ -Opioid Receptor Expression in the Rostral Ventromedial Medulla in Neuropathic Pain Rat Model. *Ann Rehabil Med.* 2015;39(3):331-9.
228. Janal MN, Colt EW, Clark WC, Glusman M. Pain sensitivity, mood and plasma endocrine levels in man following long-distance running: effects of naloxone. *Pain.* 1984 May;19(1):13-25.
229. Vaegter HB, Handberg G, Graven-Nielsen T. Similarities between exercise-induced hypoalgesia and conditioned pain modulation in humans. *Pain.* 2014;155(1):158-67.
230. Regnaud JP, Lefevre-Colau MM, Trinquart L, Nguyen C, Boutron I, Brosseau L, et al. High-intensity versus low-intensity physical activity or exercise in people with hip or knee osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Oct 29;(10):CD010203.
231. Raichlen DA, Foster AD, Seillier A, Giuffrida A, Gerdeman GL. Exercise-induced endocannabinoid signaling is modulated by intensity. *Eur J Appl Physiol.* 2013;113(4):869-75.
232. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 2013;17:162–84.
233. Fatouros IG. Is irisin the new player in exercise-induced adaptations or not? A 2017 update. *Clin Chem Lab Med.* 2017.

234. Hennigar SR, McClung JP, Pasiakos SM. Nutritional interventions and the IL-6 response to exercise. *FASEB J.* 2017;31(9):3719-3728.
235. Lopez-Alvarez VM, Puigdomenech M, Navarro X, Cobianchi S. Monoaminergic descending pathways contribute to modulation of neuropathic pain by increasing-intensity treadmill exercise after peripheral nerve injury. *Exp Neurol.* 2018;299:42-55.
236. Cobianchi S, Casals-Diaz L, Jaramillo J, Navarro X. Differential effects of activity dependent treatments on axonal regeneration and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Exp Neurol.* 2013;240:157-67.
237. López-Álvarez VM, Modol L, Navarro X, Cobianchi S. Early increasing-intensity treadmill exercise reduces neuropathic pain by preventing nociceptor collateral sprouting and disruption of chloride cotransporters homeostasis after peripheral nerve injury. *Pain.* 2015;156(9):1812-25.
238. Chen YW, Chiu CC, Hsieh PL, Hung CH, Wang JJ. Treadmill training combined with insulin suppresses diabetic nerve pain and cytokines in rat sciatic nerve. *Anesth Analg.* 2015;121(1):239-46.
239. 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).
240. Burgomaster KA, Hughes SC, Heigenhauser GJ, Bradwell SN, Gibala MJ. Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2005;98(6):1985-90.
241. Gaesser GA, Angadi SS. High-intensity interval training for health and fitness: can less be more? *Journal of applied physiology.* 2011;111:1540-1.
242. Keogh JWL, Grigg J, Vertullo CJ. Is Home-Based, High-Intensity Interval Training Cycling Feasible and Safe for Patients With Knee Osteoarthritis?: Study Protocol for a Randomized Pilot Study. *Orthop J Sports Med.* 2017; 5(3).
243. Mazzardo-Martins L, Martins DF, Marcon R, Dos Santos UD, Speckhann B, Gadotti VM, et al. High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. *J Pain.* 2010;11(12):1384-93.
244. Toti L, Bartalucci A, Ferrucci M, Fulceri F, Lazzeri G, Lenzi P et al. High-intensity exercise training induces morphological and biochemical changes in skeletal muscles. *Biol Sport.* 2013;30(4):301-9.
245. Del Valle L, Schwartzman RJ, Alexander G. Spinal cord histopathological alterations in a patient with longstanding complex regional pain syndrome. *Brain Behav Immun.* 2009;23:85–91.

246. Vartiainen NV, Kirveskari E, Forss N. Central processing of tactile and nociceptive stimuli in complex regional pain syndrome. *Clin Neurophysiol* 2008; 119:2380–8.
247. Geha PY, Baliki MN, Harden RN, et al. The brain in chronic CRPS pain: abnormal gray-white matter interactions in emotional and autonomic regions. *Neuron*. 2008;60:570–81.
248. Maihofner C, Forster C, Birklein F, et al. Brain processing during mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: a functional MRI study. *Pain*. 2005;114:93–103.
249. Maihofner C, Handwerker HO, Birklein F. Functional imaging of allodynia in complex regional pain syndrome. *Neurology*. 2006;66:711–7.
250. Devoize L, Alvarez P, Monconduit L, Dallel R. Representation of dynamic mechanical allodynia in the ventral medial prefrontal cortex of trigeminal neuropathic rats. *Eur. J. Pain*. 2011; 15, 676–682.
251. Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur. J. Pain*. 2005; 9:463–484.
252. Metz AE, Yau, HJ, Centeno MV, Apkarian AV, Martina M. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2009;106: 2423–2428.
253. Wang Y, Kawamura N, Schmelzer JD, Schmeichel AM, Low PA. Decreased peripheral nerve damage after ischemia-reperfusion injury in mice lacking TNF- α . *J Neurol Sci*. 2008;267:107–11.
254. Fiore M, Alleva E, Probert L, Kollias G, Angelucci F, Aloe L. Exploratory and displacement behavior in transgenic mice expressing high levels of brain TNF- α . *Physiol Behav*. 1998;63(4):571-6.
255. Eisenberg E, Sandler I, Treister R, Suzan E, Haddad M. Anti tumor necrosis factor - α adalimumab for complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I): a case series. *Pain Pract*. 2013;13(8):649-56.
256. Liu W, Sheng H, Xu Y, Liu Y, Lu J, Ni X. Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: relevant to proinflammatory cytokines andIDO activation. *Behav Brain Res*. 2013;242:110-6.
257. Uçeyler N, Eberle T, Rolke R, Birklein F, Sommer C. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. *Pain*. 2007;132(1-2):195-205.

258. Pretolani M. Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential. *Clin Exp Allergy*. 1999; 29(9):1164 –1171.
259. Kim JH, Kim YC, Nahm FS, Lee PB. The Therapeutic Effect of Vitamin C in an Animal Model of Complex Regional Pain Syndrome Produced by Prolonged Hindpaw Ischemia-Reperfusion in Rats. *Int J Med Sci*. 2017;14(1):97-101.
260. Pathak NN, Balaganur V, Lingaraju MC, Kant V, Latief N et al. Atorvastatin attenuates neuropathic pain in rat neuropathy model by down-regulating oxidative damage at peripheral, spinal and supraspinal levels. *Neurochem Int*. 2014;68:1-9.
261. Divald A, Powell SR. Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic. Biol. Med*. 2006; 40:156–164.
262. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S.; Suzuki K et al. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol*. 1995;79:129–135.
263. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, et al. Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1996;72(3):189-94.
264. Somani SM, Husain K. Exercise training alters kinetics of antioxidant enzymes in rat tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int*. 1996;38:587–595.
265. Devi SA, Kiran TR. Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary vitamin E in aging rat brain. *Neurobiol. Aging*. 2004;25:501–508.
266. Mailis-Gagnon A, Giannoylis I, Downar J, Kwan CL, Mikulis DJ et al. Altered central somatosensory processing in chronic pain patients with “hysterical” anesthesia. *Neurology*. 2003;60:1501–1507.
267. Strigo IA, Simmons AN, Matthews SC, Craig AD, Paulus MP. Association of major depressive disorder with altered functional brain response during anticipation and processing of heat pain. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65:1275–1284.
268. Benarroch EE. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. *Neurology*. 2008;71:217–221.
269. Saade NE, Jabbur SJ. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2008;86(1):22–47.

270. Dunckley P, Wise RG, Fairhurst M, Hobden P, Aziz Q, Chang L, Tracey I. A comparison of visceral and somatic pain processing in the human brainstem using functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci*. 2005;25:7333–7341.
271. Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci*. 2002;25: 319–325.
272. Fairhurst M, Wiech K, Dunckley P, et al. Anticipatory brainstem activity predicts neural processing of pain in humans. *Pain*. 2007;128:101–110.
273. Lebel A, Becerra L, Wallin D, et al. fMRI reveals distinct CNS processing during symptomatic and recovered complex regional- al pain syndrome in children. *Brain*. 2008;131:1854–1879.
274. Di Pietro F, Stanton TR, Moseley GL, Lotze M, McAuley JH. An exploration into the cortical reorganisation of the healthy hand in upper-limb complex regional pain syndrome. *Scand J Pain*. 2016;13:18-24.
275. Chamaa F, Chebaro M, Safieh-Garabedian B, Saadeh R, Jabbur SJ, Saadé NE. Transcriptional expression of inflammatory mediators in various somatosensory relay centers in the brain of rat models of peripheral mononeuropathy and local inflammation. *J Neuroimmunol*. 2016;297:81-91.
276. Scheid T, Bosco LD, Guedes RP, Pavanato MA, Belló-Klein A, Partata WA. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochem Res*. 2013;38(5):935-42.
277. de Souza GG, Duarte ID, de Castro Perez A. Differential involvement of central and peripheral $\alpha 2$ adrenoreceptors in the antinociception induced by aerobic and resistance exercise. *Anesth Analg*. 2013 Mar;116(3):703-11.
278. Gong X, Chen Y, Fu B, Jiang J, Zhang M. Infant nerve injury induces delayed microglial polarization to the M1 phenotype, and exercise reduces delayed neuropathic pain by modulating microglial activity. *Neuroscience*. 2017;349:76-86.
279. Chen YW, Lin MF, Chen YC, Hung CH, Tzeng JI, Wang JJ. Exercise training attenuates postoperative pain and expression of cytokines and N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in rats. *Reg Anesth Pain Med*. 2013;38:282–288.
280. Tian G, Luo X, Tang C, Cheng X, Chung SK, Xia Z, et al. Astrocyte contributes to pain development via MMP2-JNK1/2 signaling in a mouse model of complex regional pain syndrome. *Life Sci*. 2017;170:64-71.
281. Varija D, Kumar KP, Reddy KP, Reddy VK. Prolonged constriction of sciatic nerve affecting oxidative stressors & antioxidant enzymes in rat. *Indian J Med Res*. 2009;129(5):587-92.

282. Radak Z, Suzuki K, Higuchi M, Balogh L, Boldogh I, Koltai E. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radic Biol Med*. 2016;98:187-196.
283. Radak Z, Ihasz F, Koltai E, Goto S, Taylor AW, Boldogh I. The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. *Free Radic Res*. 2014;48(1):84-92.
284. Zou J, Crews F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol*. 2006;26(4-6):385-405.
285. Aguiar AS Jr, Tuon T, Pinho CA, Silva LA, Andreazza AC, Kapczinski F, et al. Intense exercise induces mitochondrial dysfunction in mice brain. *Neurochem Res*. 2008;33(1):51-8.
286. Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MO, Al-Share QY, Waldum HL, et al. . Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc Res*. 2009 Mar 1;81(4):723-32.
287. Songstad NT, Kaspersen KH, Hafstad AD, Basnet P, Ytrehus K, Acharya G. Effects of High Intensity Interval Training on Pregnant Rats, and the Placenta, Heart and Liver of Their Fetuses. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143095.
288. Freitas DA, Rocha-Vieira E, Soares BA, Nonato LF, Fonseca SR, Martins JB, et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol Behav*. 2018;184:6-11.
289. Astorino TA, Allen RP, Roberson DW, Jurancich M. Effect of high-intensity interval training on cardiovascular function, VO₂max, and muscular force. *J Strength Cond Res*. 2012;26(1):138-45.
290. Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?. *J Signal Transduct*. 2011;2011:792639.
291. Guedes RP, Araújo AS, Janner D, Belló-Klein A, Ribeiro MF, Partata WA. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cell Mol Neurobiol*. 2008;28(8):1049-56.
292. Slack SE, Pezet S, McMahon SB, Thompson SW, Malcangio M. Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 2004;20:1769–1778.
293. Martins DF, Martins TC, Batisti AP, Dos Santos Leonel L, Bobinski F, Belmonte LAO, et al. Long-Term Regular Eccentric Exercise Decreases Neuropathic Pain-like Behavior and Improves Motor Functional Recovery in an

Axonotmesis Mouse Model: the Role of Insulin-like Growth Factor-1. *Mol Neurobiol.* 2017.

294. Martins DF, Siteneski A, Ludtke DD, Dal-Secco D, Santos ARS. High-Intensity Swimming Exercise Decreases Glutamate-Induced Nociception by Activation of G-Protein-Coupled Receptors Inhibiting Phosphorylated Protein Kinase A. *Mol Neurobiol.* 2017;54(7):5620-5631.

295. Zhang XJ, Chen HL, Li Z, Zhang HQ, Xu HX, Sung JJ, et al. Analgesic effect of paeoniflorin in rats with neonatal maternal separation-induced visceral hyperalgesia is mediated through adenosine A(1) receptor by inhibiting the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;94(1):88-97.

296. Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang ZY, Brenner GJ, Wang H, Van Der Meer C, et al. Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci.* 2004; 24(38): 8310–8321.

297. Stagg NJ, Mata HP, Ibrahim MM, Henriksen EJ, Porreca F, Vanderah TW, Philip Malan T Jr. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology.* 2011;114(4):940-8.

298. Galdino G, Romero T, Andrade I, Duarte I, Perez A. Opioid receptors are not involved in the increase of the nociceptive threshold induced by aerobic exercise. *Neurosciences (Riyadh).* 2014;19(1):33-7.

299. Galdino GS, Cortes SF, Duarte ID, Perez AC. Involvement of the nitric oxide/(C)GMP/K(ATP) pathway in antinociception induced by exercise in rats. *Life Sci.* 2010;86: 505-509.

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 16 de dezembro de 2015

Registro na CEUA (código): 15.045.2.07.IV

Ao pesquisador: Daniel Fernandes Martins, Luiz Augusto Oliveira Belmonte

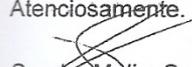
Prezado(a) Pesquisador(a),

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa “Avaliação de diferentes parâmetros de exercícios físicos na dor neuropática” foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UNISUL.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, o disposto na legislação federal aplicável à criação 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 informado imediatamente à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL.

Atenciosamente.


Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNISUL
Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina

☐ (48) 3279-1036

☐ ceua@unisul.br sandro.sgrott@gmail.com

☐ **Antes de imprimir este e-mail pense em sua responsabilidade e compromisso com o MEIO AMBIENTE**