



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DANIELA DERO LÜDTKE

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NOS EFEITOS
INDUZIDOS PELO EXERCÍCIO FÍSICO DE ALTA INTENSIDADE EM UM
MODELO ANIMAL DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA PERIFÉRICA**

DANIELA DERO LÜDTKE

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NOS EFEITOS
INDUZIDOS PELO EXERCÍCIO FÍSICO DE ALTA INTENSIDADE EM UM
MODELO ANIMAL DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA PERIFÉRICA**

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

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Palhoça

2017

L97 Lüdtkke, Daniela Dero, 1993-

Investigação do papel do sistema endocanabinoide nos efeitos induzidos pelo exercício físico de alta intensidade em um modelo animal de inflamação crônica periférica / Daniela Dero Lüdtkke. – 2017.

80 f. : il. color. ; 30 cm

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

Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins

1. Dor crônica. 2. Exercícios físicos. 3. Analgesia. 4. Inflamação. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.0472

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Investigação do papel do sistema endocanabioide na hiponocicepção induzida pelo exercício físico de alta intensidade em um modelo animal de inflamação persistente

DANIELA DERO LUDTKE
AUTORA

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 17 de fevereiro de 2017.

Doutor Daniel Fernandes Martins (orientador)

Doutora Leidiane Mazzardo Martins (Avaliador externo-UFSC)

Doutora Anna Paula Piovezan (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson Traebert

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

Dedicatória

Àqueles com os quais descobri o verdadeiro sentido da vida: minha família e meu noivo, Cristian.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter-me concedido a vida, a sabedoria e o discernimento para seguir e escolher este caminho. Sei que a fé sempre será a força necessária para lutar e vencer, e com o tempo apenas confirmei o que sempre acreditei: onde há vontade, há um caminho, porque Deus é meu guia! E assim sempre será. Obrigada, meu Deus, por mais esta dádiva e oportunidade.

Deus, obrigada também por ter colocado em minha vida o Cristian. Este sim merece todos os meus votos de agradecimento no dia de hoje, porque somente ele (e Você), sabem de tudo o que passei para chegar até aqui, o quanto foi difícil toda esta batalha, e que, por trás do diploma, houve momentos de lágrimas, o desespero, as noites não dormidas, o cansaço e a vontade de desistir. Mas, de repente, surge o “cristão”, trazendo de volta a calma, fazendo o papel da âncora e se tornando meu porto seguro. Amor, obrigada por tudo! Pela paciência, compreensão e carinho: gratidão!

Obrigada, mais do que especial, aos meus pais, que sempre foram e sempre serão a minha maior motivação. Vocês, Vilmar e Zilda, são as pessoas mais importantes da minha vida e meu maior orgulho. Tudo o que fiz e consegui, até hoje, foi e sempre será mérito de vocês, pois foi com vocês que aprendi as coisas essenciais da vida: educação, honestidade, humildade e gratidão. Então, a vocês eu só posso dizer: gratidão por tudo o que têm feito (e ainda fazem) por mim. Amo-os infinitamente.

Obrigada as minhas irmãs, Ana e Josi, que, com certeza, são as melhores do mundo. Chegar até aqui somente foi possível porque vocês me ajudaram e forneceram subsídios para isso, seja na paciência, seja na compreensão. Manas, sempre disse e vou repetir: vocês são como um espelho para mim, grandes exemplos, os quais levarei eternamente comigo. Obrigada por tudo.

E não poderia faltar aquele “obrigada” especial aos meus anjinhos: Eloiza e Ricardo, meus afilhados amados. Hoje, muito pouco vocês conhecem sobre isto aqui, mas tenham certeza de que já auxiliaram muito em toda a minha trajetória, pelo simples fato de estarem aqui, fazendo a diferença na minha vida. Obrigada, meus amores!

Outra pessoa especial (e especial mesmo) que merece meus votos de agradecimento é a Sheyla, minha companheira de todas as horas e aquela pessoa

que acredita mais em mim do que eu mesma. Então, metade que completa meu “To infinity” e a minha vida, muito obrigada por tudo!

Queria agradecer de coração ao professor Daniel, que desde o início da minha formação, naquelas aulas de neuroanatomia, encontrou alguma coisa em mim que manifestava interesse pelo laboratório e pela pesquisa. Foram alguns PIBITIs, JUNCs e congressos juntos. Hoje, saiba que você me ensinou um novo caminho, demonstrou inúmeras oportunidades e criou tantas outras. Tu és o cara, eu sou tua fã e, quando crescer, quero ser “igual” a você. Professor, obrigada por tudo o que você tem feito por mim e tem me possibilitado fazer. Serei eternamente grata a cada oportunidade. Seu trabalho é incrível e você, como pessoa, é sensacional. Sorte a nossa de ter um orientador assim. Muito obrigada!

Aproveitando, agradeço a todos os meus professores por todo conhecimento compartilhado e todas as experiências vividas. Eu sei que tive e encontrei os melhores.

Obrigada, mais do que especial, as minhas amigas: Aline Silveira e Larissa, por todas as vezes em que não as vi e que hoje comemoram comigo esta conquista. Amo vocês!

Obrigada aos meus queridos amigos e colegas do LaNEx: Ana Kuci, Kamilla Pamplona, Nathalia Donatello, Ana Carro, Daiana Salm, entre outros. Vocês ajudaram muito e tornaram a rotina do laboratório menos cansativa e mais produtiva. Obrigada também, e de modo especial, à Aline Siteneski, por ter aceitado se aventurar comigo no mundo do sistema ECB e por ter auxiliado em toda a parte experimental. Meu muito obrigada. Cada uma de vocês tem um lugar especial no meu coração.

Obrigada aos animais que possibilitaram a realização desta pesquisa e que são fonte de novas descobertas a cada dia. Obrigada à UNISUL, ao PPGCS, à Marci – por salvar nossas vidas sempre –, ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro, essencial para a concretização deste sonho.

Àqueles que, de forma direta ou indireta, auxiliaram na finalização deste trabalho, meu muito obrigada! Gratidão é a palavra.

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas.”

(Steve Jobs)

RESUMO

Introdução: Os endocanabinoides (ECBs) têm emergido como uma abordagem promissora no tratamento da dor crônica, pois a ativação de seus receptores exerce efeitos neuromodulatório, anti-inflamatório e vasodilatador, promovendo analgesia. Tais efeitos também são promovidos pelo exercício físico (EF) que, dependente da intensidade, aumenta as concentrações sanguíneas de ECBs. Objetivo: O presente estudo investigou o papel do sistema ECB nos efeitos induzidos pela natação de alta intensidade em um modelo animal de inflamação crônica periférica. Métodos: Do tipo experimental, este estudo utilizou camundongos *Swiss* machos (25-35g) mantidos em condições semelhantes e constantes, no Laboratório de Neurociência Experimental (LaNEx) da UNISUL. A inflamação crônica periférica foi induzida pela injeção intraplantar (i.pl.), contendo 20µl de solução do adjuvante completo de Freud (CFA) a 80%. Nos diferentes experimentos foram utilizados 192 camundongos, alocados em grupos de animais (n=8) não exercitados e exercitados. Os animais exercitados foram submetidos a sete dias de natação de alta intensidade, e os efeitos hiponociceptivo e antiedematogênico da natação foram analisados pelo teste de von Frey e mensuração da espessura da pata, respectivamente. Para verificar o envolvimento dos receptores canabinoides (CBs) tipo 1 e 2, antagonistas seletivos para os receptores CB₁ (AM281) e CB₂ (AM630) foram administrados sistemicamente e em sítios periférico e central, previamente à natação. Na análise do envolvimento das enzimas de degradação dos ECBs, inibidores seletivos das enzimas amido-hidrolase de ácido graxo – FAAH (URB937) – e da monoacilglicerol lipase – MAGL (JZL184) – foram administrados sistemicamente. Resultados: A natação de alta intensidade induziu hiponocicepção e reduziu o edema dos animais; o pré-tratamento dos animais com AM281 ou AM630 preveniu a hiponocicepção causada pela natação; a pré-administração de URB937 ou JZL184 prolongou a hiponocicepção induzida pela natação. Conclusão: A natação de alta intensidade induz hiponocicepção e reduz edema de animais com inflamação crônica periférica. A ativação de receptores CB₁ e CB₂, e o prolongamento da hiponocicepção pela inibição das enzimas de degradação dos ECBs confirmam a participação do sistema ECB na hiponocicepção produzida pela natação.

Descritores: Sistema endocanabinoide. Exercício físico. Dor crônica.

ABSTRACT

Introduction: Endocannabinoids (ECBs) have emerged as a promising approach in the treatment of chronic pain, since the activation of their receptors exerts neuromodulatory, anti-inflammatory and vasodilatory effects, thus promoting analgesia. These effects are also promoted by physical exercise that, depending on the intensity, increases the blood concentrations of ECBs. **Objective:** The present study investigated the role of the ECB system in the effects induced by high intensity swimming in an animal model of chronic peripheral inflammation. **Methods:** Of the experimental type, this study used male Swiss mice (25-35g) kept under similar conditions in the Laboratory of Experimental Neurosciences (LaNEx) of UNISUL. Peripheral chronic inflammation was induced by intraplantar (i.pl.) injection containing 20µl of 80% complete Freud adjuvant (CFA) solution. In different experiments, 192 mice were used, allocated to groups of animals (n = 8), not exercised and exercised. The animals that were exercised were submitted to seven days of high intensity swimming and the hyponociceptive and antiedematogenic effects of swimming were analyzed by the von Frey test and paw thickness measurements, respectively. In order to verify the involvement of cannabinoid receptors (CBs) type 1 and 2, selective antagonists for CB₁ (AM281) and CB₂ (AM630) receptors were administered systemically and at peripheral and central sites, prior to swimming. In the analysis of the involvement of ECB degradation enzymes, selective inhibitors of fatty acid amidohydrolase – FAAH (URB937) – and monoacylglycerol lipase – MAGL (JZL184) – were administered systemically. **Results:** High intensity swimming induced hyponociception and reduced edema in animals; the pretreatment of animals with AM281 or AM630 prevented swimming-induced hyponociception; the pre-administration of URB937 or JZL184 prolonged swimming-induced hyponociception. **Conclusion:** High intensity swimming induces hyponociception and reduces edema in animals with chronic peripheral inflammation. The activation of CB₁ and CB₂ receptors, as well as the prolongation of hyponociception by the inhibition of ECB degradation enzymes confirms the participation of the ECB system in swimming-induced hyponociception.

Keywords: Endocannabinoid system. Physical exercise. Chronic pain.

LISTAS

Lista de abreviaturas

Δ^9 -THC – Δ^9 -tetrahydrocannabinol (do inglês, *Δ^9 -Tetrahydrocannabinol*)

2-AG – 2-araquidonil glicerol (do inglês, *2-Arachidonoylglycerol*)

2-AGT – Transportador para 2-araquidonil glicerol (do inglês, *2-arachidonoylglycerol transporter*)

ABHD4 – α,β -hidrolase 4 (do inglês, *α,β -hydrolase domain-containing protein 4*)

AC – Adenilato ciclase

AEA – Anandamida (do inglês, *anandamide*)

AIEF – Analgesia induzida pelo exercício físico

AM1241 – Agonista do receptor canabinoide tipo 2

AM251 – Antagonista seletivo para receptores canabinoides tipo 1

AM281 – Antagonista seletivo para receptores canabinoides tipo 1

AM630 – Antagonista seletivo para receptores canabinoides tipo 2

AMPC – Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*)

ANOVA – Análise de Variância (do inglês, *analysis of variance*)

ANT – Transportador de membrana para anandamida (do inglês, *anandamide transporter*)

AR – Artrite reumatoide

ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês, *adenosine triphosphate*)

CB – Canabinoide

CB₁ – Canabinoide tipo 1

CB₂ – Canabinoide tipo 2

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA – Adjuvante completo de Freund (do inglês, *Complete Freund's Adjuvant*)

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês, *calcitonin gene-related peptide*)

CPME – Corno posterior da medula espinal

DAGL- α – Diacilglicerol lipase alfa (do inglês, *diacylglycerol lipase alpha*)

DAGL- β – Diacilglicerol lipase beta (do inglês, *diacylglycerol lipase beta*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

ECBs – Endocanabinoides

EF – Exercício físico

E.P.M – Erro-padrão da média

FAAH – Amido-hidrolase de ácidos graxos (do inglês, *fatty acid amide hydrolase*)

GDE-1 – Glicerofosfodiesterase-1 (do inglês, *Glycerophosphodiester Phosphodiesterase 1*)

G_{i/o} – Proteína G_{i/o} subunidade α

GP-AEA – Anandamida glicerofosfato (do inglês, *glycerophospho-arachidonoyl ethanolamide*)

GPCR – Receptores acoplados à proteína G (do inglês, *G-protein-coupled receptors*)

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain*)

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

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

IL-6 – Interleucina-6 (do inglês, *interleukin-6*)

IL-8 – Interleucina-8 (do inglês, *interleukin-8*)

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

IL-13 – Interleucina-13 (do inglês, *interleukin-13*)

IM – Inibição máxima

i.p. – Intraperitoneal

i.pl. – Intraplantar

i.t. – Intratecal

JZL 184 – Inibidor da monoacilglicerol lipase

LaNEEx – Laboratório de Neurociências Experimental

MAGL – Monoacilglicerol lipase (do inglês, *monoacylglycerol lipase*)

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês, *mitogen-activated protein kinases*)

ME – Medula espinal

MIA – Morte indolor assistida

NAPE – N-araquidonil fosfatidil etanolamina (do inglês, *N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine*)

NAPE-PLC – N-araquidonil fosfatidil etanolamina fosfolipase C (do inglês, *N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine phospholipase C*)

NAPE-PLD – N-araquidonil fosfatidil etanolamina fosfolipase D (do inglês, *N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine phospholipase D*)
 NO – Óxido nítrico (do inglês, *Nitric Oxide*)
 OA – Osteoartrite
 OEA – Oleiletanolamida (do inglês, *oleoylethanolamide*)
 P-AEA – Anandamida fosfato (do inglês, *phosphoanandamide*)
 PAF – Fator de ativação plaquetária (do inglês, *platelet-activating factor*)
 PAG – Substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *periaqueductal gray*)
 P-ase – Fosfatase (do inglês, *phosphatase*)
 PEA – Palmitoiletanolamida (do inglês, *palmitoylethanolamide*)
 PG – Prostaglandina
 PKA – Proteína quinase A (do inglês, *protein kinase A*)
 PLC – Fosfolipase C (do inglês, *phospholipase C*)
 PLD – Fosfolipase D (do inglês, *phospholipase D*)
 RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, *messenger ribonucleic acid*)
 SARA – Sistema ativador reticular ascendente (do inglês, *ascending reticular activating system*)
 sn1-acil-2-AG: sn1-acil-2-araquidonilglicerol (do inglês, *sn1-acyl-2-arachidonoylglycerol*)
 SNC – Sistema nervoso central
 SNP – Sistema nervoso periférico
 SR144528 – Antagonista seletivo para receptores canabinoides tipo 2
 TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*)
 UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
 UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina
 URB602 – Inibidor da monoacilglicerol lipase
 URB937 – Inibidor da amido-hidrolase de ácidos graxos
 WIN 55,212-2 – Agonista não seletivo para receptores canabinoides tipo 1 e 2

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo..... 48

Lista de figuras

Figura 1 – Migração celular para o sítio inflamatório.....	20
Figura 2 – Processamento da nocicepção.....	23
Figura 3 – Modulação endógena da dor.....	31
Figura 4 – Síntese e degradação da Anandamida.....	33
Figura 5 – Síntese e degradação do 2-AG.....	34
Figura 6 – Receptores canabinoides.....	35
Figura 7 – Banheira para natação.....	44
Figura 8 – Desenho experimental.....	45
Figura 9 – Teste de von Frey.....	46
Figura 10 – Decurso temporal da hiponocicepção induzida pela natação no modelo de inflamação crônica periférica causada pelo CFA em camundongos....	50
Figura 11 – Efeito antiedematogênico induzido pela natação no modelo de inflamação crônica periférica causada pelo CFA em camundongos.....	51
Figura 12 – Envolvimento dos receptores CB ₁ no efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade no modelo de inflamação crônica periférica induzida pelo CFA em camundongos.....	52
Figura 13 – Envolvimento dos receptores CB ₂ no efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade no modelo de inflamação crônica periférica induzida pelo CFA em camundongos.....	52
Figura 14 – Participação das enzimas de degradação dos ECBs, no efeito hiponociceptivo induzido pela natação de alta intensidade, no modelo de inflamação crônica periférica induzida pelo CFA em camundongos.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1 – Sítios e doses das administrações dos antagonistas para os receptores CB ₁ e CB ₂	47
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
1.1.1 Processo inflamatório	19
1.1.2 Processamento da dor	21
1.1.2.1 Doenças musculoesqueléticas crônicas.....	24
1.1.2.2 Modelo animal de OA.....	25
1.1.3 Fisiopatologia da hiperalgesia inflamatória	26
1.1.4 Exercício físico (EF)	28
1.1.5 Sistemas endógenos de controle da dor	30
1.1.5.1 Sistema ECB.....	32
1.1.5.2 Receptores CBs e dor.....	34
1.1.5.3 EF e sistema ECB.....	36
2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL.....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3. MÉTODOS	40
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	40
3.2 FÁRMACOS E REAGENTES.....	40
3.3 ANIMAIS.....	40
3.3.1 Grupos experimentais	41
3.4 PROTOCOLO DE NATAÇÃO.....	43
3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	44
3.6 MODELO ANIMAL DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA PERIFÉRICA E MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	46
3.6.1 Mensuração da espessura da pata	47
3.6.2 Investigação do papel do sistema ECB na hiponocicepção induzida pela natação de alta intensidade	47
3.6.2.1 Avaliação do envolvimento dos receptores CB ₁ e CB ₂ no efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade.....	47

3.6.2.2 Avaliação da participação das enzimas de degradação dos ECBs no efeito hiponociceptivo da natação.....	48
3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	48
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	48
3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1 EFEITO HIPONOCICEPTIVO DA NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE.....	50
4.2 EFEITO DA NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE O EDEMA DE PATA.....	51
4.3 EFEITO HIPONOCICEPTIVO DA NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE REQUER ATIVAÇÃO DE RECEPTORES CB ₁ E CB ₂	51
4.4 INIBIÇÃO DAS ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DOS ECBs CONTRIBUI PARA O MECANISMO DE AÇÃO HIPONOCICEPTIVA DA NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE.....	53
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	62
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICE.....	80
APÊNDICE A – Produção científica publicada durante o período do Mestrado.....	80
ANEXO.....	81
ANEXO A – Parecer Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	81

1. INTRODUÇÃO

A dor, de uma forma geral, apresenta-se como um mecanismo de alerta, com a finalidade de homeostase e, principalmente, proteção do organismo, sendo caracterizada como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial¹. Esse fenômeno, que mundialmente afeta milhares de pessoas², geralmente pode ser investigado tanto em condições fisiológicas normais – definido como dor nociceptiva normal – quanto em condições patológicas como, por exemplo, dor de origem inflamatória ou neuropática³.

Recentemente, abordagens que promovem a liberação do uso de endocanabinoides (ECBs) têm emergido como uma nova opção terapêutica no tratamento da dor persistente^{4,5}. O sistema ECB é composto por dois receptores canabinoides (CBs) bem identificados (CB₁ e CB₂); ligantes endógenos, incluindo a anandamida (AEA) e 2-araquidonilglicerol (2-AG); e pelas enzimas responsáveis pelo metabolismo dos ligantes^{6,7}. Ambos os receptores CBs são acoplados à proteína Gi e estão localizados tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto no sistema nervoso periférico (SNP), participando do processamento da dor nos sítios periférico, espinal e supra-espinal^{5,8,9}. A AEA é hidrolisada pela enzima amido-hidrolase de ácido graxo (FAAH), e o 2-AG é degradado pela enzima monoacilglicerol lipase (MAGL), sendo assim, a inibição da atividade dessas enzimas resulta em concentrações elevadas desses ECBs no SNC e SNP. Nesse sentido, a inibição dessas enzimas pode representar uma alternativa para ampliar o potencial efeito terapêutico dos ECBs, visto que a inibição da degradação dos ECBs produz analgesia, já demonstrada em modelos animais de dor aguda^{7,10}.

Estímulos fisiológicos (por exemplo a alimentação) e condições patológicas (por exemplo a inflamação) induzem ao aumento nas concentrações dos ECBs no SNC em diferentes proporções. Além disso, os ECBs modulam a função de neurônios, células neurogлияis e endoteliais, exercendo efeitos anti-inflamatório e vasodilatador, sendo a analgesia a principal ação terapêutica¹¹.

Nesse contexto, pesquisas têm demonstrado a participação do sistema ECB na analgesia induzida pelo exercício físico (AIEF)¹²⁻¹⁴. Sabe-se que a prática de exercício físico (EF) regular produz benefícios tanto para a saúde física quanto para a saúde mental^{15,16}, bem como influencia no limiar nociceptivo no repouso e após o

EF^{17,18}. Ademais, o EF também acelera os processos de reparo após inflamação¹⁹. Assim, recentes achados mostram que o EF é a abordagem mais utilizada no tratamento da dor persistente²⁰ e que, em paralelo a esses achados, estudos mostram que o EF produz aumento nas concentrações sanguíneas de ECBs^{4,21}, sendo esse efeito dependente da intensidade²².

Contudo, atualmente, tem sido demonstrado que o EF aumenta o limiar nociceptivo por meio do sistema ECB, em condições de dor fisiológica^{12,13}. Para isso, são utilizados animais saudáveis que, quando submetidos ao EF, apresentam aumento do limiar nociceptivo mediante estímulos inócuos ou nocivos mecânicos ou térmicos.

Nesse sentido, Galdino e colaboradores (2014a e 2014b), em estudos pré-clínicos com ratos saudáveis submetidos a diferentes tipos de exercício – aeróbico (em esteira) e de resistência (levantamento de peso) –, observaram efeito anti-hiperalgésico mediado pela ativação de receptores CB₁ e CB₂, bem como aumento nas concentrações plasmáticas de AEA, 2-AG, oleoiletanolamida (OEA) e palmitoiletanolamida (PEA)^{12,13}. Além disso, Fuss e colaboradores (2015), em estudo envolvendo camundongos transgênicos, submetidos à roda de corrida, observaram redução na sensibilidade térmica (placa quente) à dor e aumento das concentrações plasmáticas de AEA, 2-AG, PEA, OEA e ácido araquidônico no grupo dos animais exercitados²³.

Em contrapartida, em estudos envolvendo seres humanos, não foi avaliado o efeito do EF em condições dolorosas decorrentes de inflamação ou outras causas, sendo apenas demonstrado o aumento nas concentrações plasmáticas de ECBs após a realização de EF^{24,25}.

É importante destacar que tais estudos foram realizados na condição saudável e sem a presença de dor. Assim, torna-se necessário verificar se a natação também pode induzir a liberação de ECBs em um modelo de inflamação periférica que mimetize condições inflamatórias crônicas.

Sabe-se que na dor inflamatória, as células imunológicas liberam substâncias que ativam e modificam a resposta em neurônios primários nociceptivos, causando sensibilização periférica. E, durante a inflamação prolongada, a capacidade de resposta dos neurônios no corno posterior da medula espinal (CPME) é aumentada, induzindo alterações duradouras na excitabilidade, o que leva à sensibilização central. Todavia, evidências sugerem que os ECBs podem modular a dor inflamatória pela

inibição desses fenômenos²⁶, sendo assim, Smith e colaboradores (1998) demonstraram que a administração de AEA produziu antinocicepção no modelo de artrite inflamatória crônica induzida pelo adjuvante completo de Freud (CFA)²⁷. Da mesma forma, Ahn e colaboradores (2009) observaram que a inibição da amido-hidrolase de ácido graxo (FAAH) induziu efeito anti-hiperalgésico no modelo de CFA via ativação de receptores CB₁ e CB₂¹⁰. É, portanto, interessante mencionar que a administração sistêmica de URB602 (inibidor da monoacilglicerol lipase – MAGL) preveniu e reduziu a inflamação e a dor induzidas pela carragenina via receptores CB₂²⁸.

Nesse contexto, o presente estudo foi realizado a fim de explorar o possível envolvimento dos receptores CBs e das enzimas de degradação dos ECBs nos efeitos da natação de alta intensidade, em um modelo animal de inflamação crônica periférica induzida pelo CFA.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Processo inflamatório

A inflamação, no seu amplo aspecto, apresenta dupla funcionalidade. Primeiramente, o organismo, por meio do processo inflamatório, defende-se dos agentes agressores e infecciosos e, assim, mantém a homeostase. Em contrapartida, esse mesmo processo é a base para o desenvolvimento de várias doenças crônicas²⁹. Sabe-se que, durante o processo inflamatório, há uma resposta tecidual e, com isso, o surgimento de sinais que caracterizam esse evento fisiopatológico. Tais sinais, descritos e identificados há muitos anos, envolvem o rubor, caracterizado pela coloração avermelhada, que é resultado do aumento de volume sanguíneo para o local acometido; tumor, relacionado ao edema, sendo este consequência do aumento da permeabilidade microvascular, bem como do extravasamento de líquido para o interstício; calor, que surge devido ao aumento do fluxo sanguíneo na região, assim como pela atividade metabólica aumentada de mediadores inflamatórios; dor, provocada em virtude da alteração vascular periférica, bem como ativação ou sensibilização de nociceptores; e perda da função, consequência de todos os fatores associados (rubor, tumor, calor e dor)²⁹⁻³¹.

Todo esse mecanismo envolvido no processo inflamatório é desencadeado pelo aumento do fluxo sanguíneo associado ao aumento da permeabilidade vascular, dilatação das vênulas e recrutamento de células para o local da lesão ou infecção (Figura 1). Assim, é importante observar que esse fenômeno vascular, celular e bioquímico é regulado por mediadores inflamatórios que são produzidos por células do sistema imunológico e por células do próprio tecido lesionado^{32,33}.

Há inúmeros mediadores inflamatórios, contudo, a histamina, a serotonina, os componentes do sistema complemento, as citocinas e o óxido nítrico (NO) são os principais mediadores da resposta inflamatória. Além destes, há outros mediadores identificados e que também desempenham um papel fundamental no processo inflamatório, dentre eles, podem-se citar: as cininas, neurocininas, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), as prostaglandinas (PGs), os leucotrienos e o fator de ativação plaquetária (PAF)³³.

A vasodilatação, que ocorre durante a inflamação, é gerada em consequência da ação do NO, assim como pela atuação de PGs vasodilatadoras sobre as células endoteliais. Desse modo, os mediadores inflamatórios chegam facilmente ao sítio da lesão³². Nesse contexto, associado à vasodilatação, ocorre o extravasamento de fluídos, desencadeando o recrutamento de leucócitos para o local lesionado (Figura 1). Todo esse processo ocorre em três diferentes etapas: marginalização, adesão ao endotélio e migração celular. Além disso, há uma comunicação química entre as células de defesa do organismo com as células infecciosas, dessa forma, neutrófilos e demais leucócitos são atraídos para o local lesionado por ação de moléculas quimioatraentes, cuja função é atrair as células de defesa para o local inflamado³⁴.

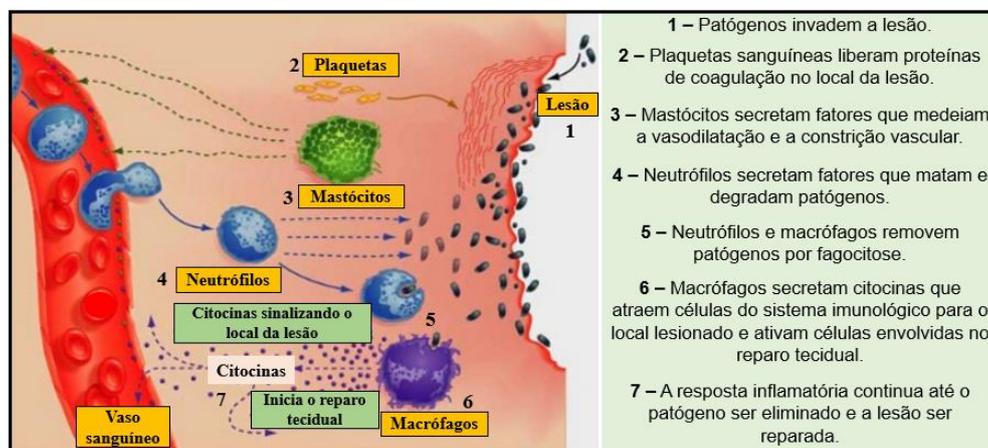


Figura 1 – Migração celular para o sítio inflamatório. Imagem ilustrativa do processo inflamatório, representando a migração de células de defesa para o local da lesão.

Fonte: adaptada de Schneider e Barros (2016)³⁵.

No local da inflamação, os leucócitos (neutrófilos e macrófagos) atuam sobre os patógenos e, através da fagocitose, promovem a remoção de resíduos celulares (Figura 1). No entanto, os neutrófilos tendem a se acumular no tecido e, posteriormente, sofrem apoptose. Tal acúmulo de neutrófilos atrai monócitos para o local, os quais se diferenciam em macrófagos e estes, por sua vez, removem os neutrófilos apoptóticos, favorecendo a limpeza inicial. Quando esse processo não ocorre com eficiência, há prejuízo para o tecido, predispondo o surgimento de processos crônicos, bem como de doenças inflamatórias³⁶.

Todo esse processo inicial atua facilitando a remoção do agente agressor. Contudo, a ativação do sistema complemento leva à formação de outros mediadores inflamatórios, tais como a bradicinina, que contribui para o aumento da sensibilidade neuronal a estímulos que normalmente produziram pouca ou nenhuma dor. Esse fenômeno é denominado alodinia e é característico da dor inflamatória³⁷. Além disso, quando um estímulo que geralmente causaria dor torna-se capaz de gerá-la com uma intensidade muito maior do que o normal, recebe a denominação de hiperalgesia³⁸. Dessa forma, observa-se que a resposta inflamatória é um mecanismo bastante complexo e atuante na defesa do organismo, pois alerta ao ser vivo o local da lesão. Todavia, estando esse mecanismo desregulado, a inflamação se torna crônica, predispondo o organismo a várias doenças³⁷.

1.1.2 Processamento da dor

Inicialmente, a palavra dor remete a uma ideia negativa e desagradável. No entanto, a capacidade de detectar estímulos nocivos é imprescindível para a sobrevivência, integridade e bem-estar de um organismo, uma vez que a sensação de dor atua como um mecanismo de alerta, sendo, portanto, sua principal função a de informar sobre um perigo real ou iminente de lesão, acionando respostas adequadas de proteção até que a causa tenha sido identificada e abolida³⁸.

Há uma série de fatores constitucionais, situacionais, comportamentais e emocionais que influenciam na fisiologia da percepção dolorosa no ser humano e, por isso, um estímulo nocivo de mesma intensidade pode provocar diferentes reações. Dessa forma, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como “[...] uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”, ou

seja, a dor é uma experiência complexa que inclui múltiplas dimensões³⁸. Por esse motivo, é considerada como uma das modalidades perceptuais do corpo com maior grau de complexidade³⁹.

Apesar de seu caráter comumente protetor, alterações na via da dor podem levar à hipersensibilidade. Nesse caso, a dor perde sua função como um sistema de alerta e em vez de aguda pode se tornar crônica e debilitante. Isto pode ser visto, dependendo do nível, como a extensão de um processo normal de cura, em que o dano nervoso ou tecidual causa hiperatividade a fim de promover a proteção da área lesionada³⁸.

No aspecto geral, a dor leva o indivíduo a manifestar sintomas como reduções nos padrões de sono, apetite e libido, manifestações de irritabilidade, alterações de energia, diminuição da capacidade de concentração, restrições na capacidade para as atividades familiares, profissionais e sociais. Todavia, em indivíduos com dor crônica, a persistência da dor prolonga a existência desses sintomas, podendo exacerbá-los⁴⁰.

Ao contrário da dor aguda, a dor crônica é caracterizada por um estado patológico bem definido, no qual ocorre uma disfunção do sistema somatossensorial, persistindo além da solução do seu processo etiológico. Nesse sentido, a dor crônica não é apenas um sintoma, mas é, por si só, uma doença⁴¹. Além disso, dados estatísticos indicam que a dor crônica é a causa mais comum de incapacidade a longo prazo, acometendo em torno de 1,5 bilhões de pessoas em todo o mundo, e, como o processo natural do ser humano é o envelhecimento, o número de pessoas que necessitam de tratamento para a dor cresce a cada ano².

É importante ressaltar que a dor sentida por humanos abrange componentes de aspectos neurais, fisiológicos, comportamentais, psicológicos e emocionais. Entretanto, a dor que um animal é capaz de sentir pode envolver também muitos aspectos, todavia, na maioria dos estudos, os mecanismos neuronais (fisiológicos) são mensurados e definidos como nocicepção. Termo este que deriva do latim, *nocere*, que significa ferir; conseqüentemente, a nocicepção é definida como a parte fisiológica da dor, desprezando os aspectos emocionais e psicológicos^{38,42}.

Com base nisso, a nocicepção se refere ao processo neuronal de interpretação e processamento de estímulos nocivos, como ilustrado na Figura 2, envolvendo diferentes etapas^{39,43}, a saber: 1) Transdução: que se refere à conversão da energia gerada por um estímulo nocivo de origem térmica, mecânica ou química em potencial

de ação pelos receptores sensoriais, sendo estes denominados nociceptores; 2) **Condução**: que consiste na propagação do impulso elétrico do SNP até o SNC. A condução se inicia nas fibras de neurônios nociceptivos que são classificadas de acordo com seu diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução. As fibras classificadas como do tipo A δ (pouco mielinizadas, conduzem o impulso elétrico em uma velocidade entre 12 e 30 m/s) e do tipo C (não possuem bainha de mielina, conduzem estímulo a uma velocidade muito mais lenta, em torno de 0,5 a 2 m/s) são responsáveis pela propagação do estímulo nociceptivo; 3) **Transmissão**: ocorre no CPME, o qual é constituído por lâminas; quando os neurônios nociceptivos periféricos transmitem a informação do SNP para o SNC, por meio da liberação de neurotransmissores, que agem em seus receptores pós-sinápticos nos neurônios do CPME, as fibras C chegam na lâmina II, fazem sinapse com interneurônios e esses, por sua vez, fazem sinapse na lâmina mais superficial, chamada de lâmina I ou marginal. Esse conjunto de neurônios se projeta para centros encefálicos superiores, especificamente para o tálamo. Os neurônios sensoriais nociceptivos que ativam neurônios no CPME liberam duas classes principais de neurotransmissores, o glutamato e os neuropeptídios, sendo o glutamato o neurotransmissor primário; 4) **Modulação**: esse passo está relacionado aos impulsos descendentes inibitórios ou facilitadores que modulam a transmissão nociceptiva na medula espinal; e 5) **Percepção**: trata-se da assimilação dos sinais que chegam a estruturas superiores e são interpretados como dor.

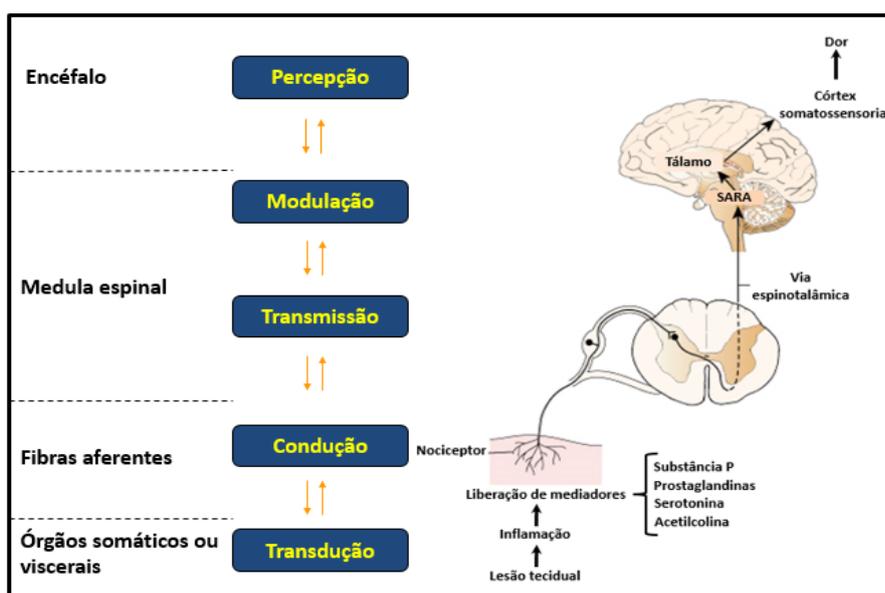


Figura 2 – Processamento da nocicepção. Este fenômeno é constituído por cinco diferentes fases: a primeira etapa ocorre na periferia, com a propagação do sinal através do potencial de ação, sendo este

conduzido por fibras específicas até o corno posterior da medula espinal e, através de neurotransmissores, a informação é transmitida para centros superiores, havendo a modulação e a percepção desses sinais. *SARA: Sistema ativador reticular ascendente.

Fonte: adaptada de Basbaum e colaboradores (2009)³⁹.

1.1.2.1 Doenças musculoesqueléticas crônicas

Dentre as doenças crônicas, as condições musculoesqueléticas se destacam devido à alta prevalência, forte impacto social e por serem consideradas as causas mais comuns de dor grave e de incapacidade física a longo prazo, afetando milhares de pessoas em todo o mundo. Nesse sentido, essas afecções musculoesqueléticas são diversificadas no que diz respeito à fisiopatologia, porém a dor e a debilidade física funcional estão presentes, abrangendo distintas patologias, desde aquelas de início agudo e de curta duração, assim como aqueles distúrbios ao longo da vida, incluindo artrite reumatoide (AR), osteoartrite (OA) e dor lombar⁴⁴.

A AR é uma doença inflamatória, de etiologia desconhecida, com envolvimento generalizado da articulação sinovial, sendo a forma mais comum de poliartrite crônica e, apesar do caráter sistêmico, afeta predominantemente as articulações periféricas. A sinovite persistente, característica dessa patologia, leva à destruição das articulações, resultando em morbidade a longo prazo e aumento da mortalidade⁴⁴.

O processo inflamatório inclui infiltração de células do sistema imunológico, hiperplasia sinovial, dor e edema. Assim, as células do sistema imunológico infiltradas desempenham um importante papel no processo inflamatório. Primeiramente, as células residentes no tecido inflamado liberam moléculas pró-inflamatórias, tais como citocinas e PGs, que agem como sinais de alerta. Essas moléculas promovem a infiltração de leucócitos dentro do tecido inflamado através da expressão aumentada de quimiocinas e moléculas de adesão. Dessa forma, as células inflamatórias produzem mediadores inflamatórios, agravando ainda mais a inflamação sinovial⁴⁵.

Por sua vez, a OA é caracterizada por áreas localizadas, acomete articulações sinoviais, havendo perda articular e dano cartilaginoso. Clinicamente, observa-se dor nas articulações, limitação de movimento, crepitação, edema e grau variável de inflamação local. Pode ocorrer em qualquer articulação, contudo, torna-se mais comum no quadril, joelho e nas articulações das mãos, pés e coluna vertebral⁴⁴.

Dentre as doenças musculoesqueléticas crônicas, a OA se destaca como um problema de saúde pública, devido à incapacidade e às morbidades resultantes desse

processo patológico⁴⁶. Mundialmente, essa patologia está entre as doenças articulares mais comuns, acometendo principalmente a população em envelhecimento^{47,48}. Em relação aos fatores de risco, observa-se que a localização articular, bem como a etnia, o gênero, a obesidade, a predisposição genética, o mau alinhamento articular, o estado nutricional e o nível de atividade física propiciam o desenvolvimento da doença^{46,48,49}.

Há relatos na literatura de que a articulação com OA apresenta características comuns de células inflamatórias no líquido sinovial, havendo a presença de células mononucleares de infiltração, produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores de degeneração das articulações que contribuem para a progressão do dano articular⁴⁸⁻⁵⁰.

Diante do exposto, buscam-se abordagens terapêuticas com o intuito de intervir e resolver esse problema, cujo objetivo principal é prevenir as incapacidades gerais e a progressão dos danos estruturais, uma vez que o aumento da inflamação articular está associado com a progressão do dano articular. Dessa forma, o tratamento principal tem como foco reduzir a inflamação e a dor nos indivíduos acometidos pelo problema⁴⁸.

1.1.2.2 Modelo animal de OA

Após lesão tecidual, como a que ocorre em doença autoimune ou mediante exposição a agentes irritantes, o sistema imunológico libera mediadores inflamatórios que ativam e sensibilizam o sistema nociceptivo^{51,52}. Isto porque a maioria dos modelos de dor inflamatória depende da administração de substâncias que induzem uma resposta imune^{52,53}. Nesse sentido, o teste da formalina pode ser considerado como um modelo de dor inflamatória a curto prazo. Contudo, estudos experimentais envolvendo dor inflamatória geralmente utilizam compostos com potencial antigênico, tais como o CFA ou a carragenina⁵². O primeiro é constituído por microbactérias (*Mycobacterium butyricum* ou *Mycobacterium tuberculosis*) mortas pelo calor, suspensas num veículo de óleo mineral^{54,55}, enquanto que a carragenina é composta por polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas⁵².

Dessa forma, o modelo de artrite induzida pelo CFA consiste na administração desse composto no espaço próximo ou intra-articular do tornozelo⁴⁵. Assim, o CFA é

empregado para produzir uma condição artrítica em roedores, servindo como um modelo de laboratório útil em estudos de dor crônica e inflamação^{54,55}.

Importa registrar que a artrite crônica é caracterizada por inflamação das articulações, destruição da cartilagem e erosão óssea, persistindo por várias semanas⁵⁶. Como resultado desse processo, edema e dor são produzidos 12 horas após a administração do composto. Nesse modelo de artrite, há um aumento nas concentrações de PGs e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), observadas no fluido sinovial. A presença de citocinas na membrana sinovial inflamada leva à formação de osteoclastos, estando estes envolvidos na reabsorção mineral de cartilagem e osso. Entretanto, a sinovite não é considerada um achado comum de OA, porém desempenha um importante papel no desenvolvimento da doença e, dessa forma, representa um alvo para o tratamento futuro⁴⁵.

1.1.3 Fisiopatologia da hiperalgesia inflamatória

Conforme descrito anteriormente, no processo inflamatório, rubor, calor, tumor, dor e perda da função são os sinais cardinais da resposta inflamatória. Dentre estes, a dor se destaca, pois gera incapacidade e sofrimento ao indivíduo. A presença de tecidos danificados e de neurônios sensoriais nociceptivos ativados pela participação de mediadores inflamatórios, principalmente as citocinas, predispõe ao desenvolvimento da dor inflamatória. Esta, quando aguda, resulta da ação de um estímulo desencadeante ou de determinados mediadores, tais como a bradicinina, que facilita a ativação dos neurônios periféricos sensibilizados³⁷.

Assim, a hiperalgesia inflamatória resulta das modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos. Tais modificações são alterações metabólicas que facilitam a sua ativação, ocorrem em todo neurônio sensorial e são induzidas por mediadores inflamatórios (tais como: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e quimiocinas), sendo estes liberados diretamente pelas células lesionadas em decorrência do trauma tecidual ou pelo reconhecimento de um elemento estranho ao organismo por células residentes, como os macrófagos³⁷.

Durante o processo inflamatório (indução, manutenção e resolução), ocorre uma sequência bem definida de liberação dos mediadores, sendo estes chamados de mediadores intermediários (citocinas, quimiocinas, bradicinina e os fatores do

complemento C3a e C5a) e finais (PGs, prostaciclina, aminas simpáticas, leucotrienos, PAF, histamina e serotonina). Todo esse evento fisiopatológico é de extrema importância clínica, visto que, havendo o bloqueio de um desses passos, pode-se inibir o desenvolvimento de determinados eventos, sinais e sintomas do processo inflamatório, inclusive a dor³⁷.

Nesse sentido, os mediadores inflamatórios intermediários, durante a resposta imune inata, são liberados no início e durante a inflamação, sendo também responsáveis pela liberação de outros mediadores intermediários. Contudo, os mediadores hiperálgicos finais produzem sensibilização neuronal por ativar seus respectivos receptores, bem como por estimular vias de sinalização intracelular, alterar as características elétricas da membrana neuronal e por modificar o limiar de ativação de vários canais iônicos, presentes na membrana e nas organelas citosólicas³⁷.

Dentre os mediadores intermediários, as citocinas e as quimiocinas se destacam como os elementos mais característicos da dor inflamatória, conseqüentemente, a presença destas é de extrema importância para a continuidade do processo fisiopatológico. Esses mediadores, além de recrutar leucócitos (neutrófilos) para o foco inflamatório, também contribuem para a gênese da sensibilização nociceptiva. Dessa forma, as citocinas mais importantes no desenvolvimento da dor inflamatória são o TNF- α , IL-1 β e IL-8. Em relação às principais fontes de citocinas, citam-se as células residentes, tais como as células dendríticas, os macrófagos, os linfócitos e os mastócitos, os quais desempenham papel importante no desenvolvimento da dor inflamatória^{37,57}.

Além dessas características, as citocinas são subdivididas de acordo com a sua atividade, sendo assim, há citocinas que promovem a inflamação e são chamadas pró-inflamatórias, enquanto outras inibem a atividade destas últimas e são chamadas de anti-inflamatórias como, por exemplo, IL-4, IL-10, e IL-13. Todas essas moléculas são necessárias para conduzir a resposta inflamatória em locais onde há infecção e/ou lesão, favorecendo a cicatrização do tecido de forma adequada. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias no local da lesão pode manifestar-se como instabilidade hemodinâmica ou disfunção metabólica^{58,59}.

Na maioria das vezes, havendo a resolução do processo inflamatório, a sensibilidade aumentada do tecido inflamado desaparece. Contudo, em certas

situações, mesmo após a resolução do processo inflamatório, quando não se observa lesão aparente no local, a dor continua ou reaparece após algum tempo³⁷.

Diante do exposto, observa-se que a dor periférica se torna crônica devido às características próprias de um processo patológico (persistência). Nesse sentido, pode haver a sensibilização de neurônios centrais do circuito nociceptivo e mesmo de centros associados à percepção da nocicepção, causando a amplificação do estímulo periférico e, dessa forma, dificuldade no tratamento da dor inflamatória crônica⁶⁰.

1.1.4 Exercício físico (EF)

Com o intuito de amenizar e tratar a dor crônica, recursos terapêuticos são empregados em programas multidisciplinares de reabilitação, dentre estes, cita-se o EF como a estratégia mais utilizada, pois a sua prescrição para o tratamento desse tipo de dor é sugerida há mais de 20 anos pela literatura científica²⁰.

O EF caracteriza-se por uma situação que retira o organismo de sua homeostase, pois implica no aumento instantâneo da demanda energética da musculatura exercitada e, conseqüentemente, do organismo como um todo⁶¹, estando relacionado a qualquer atividade física planejada, estruturada e repetitiva, cujo objetivo é a melhora ou manutenção da aptidão física, mesmo que este seja um estresse fisiológico aos processos sistêmicos biológicos que exigem solicitações energéticas acima do nível de repouso⁶².

Recentemente, sabe-se que a prática de EF produz benefícios tanto para a saúde física quanto mental, uma vez que há redução da incidência de doenças^{15,16}, além de promover neuroproteção, neuroplasticidade, melhora da cognição, diminuição da ansiedade e da depressão e da capacidade de influenciar o limiar nociceptivo^{17,18}. Em contrapartida, um estilo de vida sedentário é um fator de risco para doenças cardiovasculares e outros quadros crônicos, como câncer e hipertensão arterial⁶³.

Além disso, os EFs realizados de forma regular também são capazes de acelerar os processos de reparo na inflamação. Nesse sentido, há evidências de que os exercícios interferem em várias etapas do processo inflamatório, promovendo migração de leucócitos em direção ao foco da inflamação e aumento da capacidade de fagocitose dessas células em seres humanos e animais¹⁹.

Embora o EF seja a mais comum dentre as modalidades dos tratamentos multidisciplinares, o efeito analgésico do exercício ainda é contraditório. Enquanto alguns estudos clínicos demonstram a redução da dor após a realização de EF, outros relatam a ausência de efeitos dos exercícios sob a percepção da dor e, ainda, há aqueles que apontam exacerbação da dor depois do EF, sobretudo após exercícios de resistência²⁰.

Os resultados da maioria dos estudos apontam uma redução da dor após a realização de EFs; assim, alguns pesquisadores têm-se referido a esse fenômeno como AIEF, observado em seres humanos e animais¹⁹. Contudo, os efeitos neurofisiológicos que explicam esse fenômeno ainda não foram completamente elucidados. Uma das hipóteses mais aceitas, portanto, é a influência do EF nos mecanismos endógenos de controle da dor²⁰.

Ademais, a natação é uma das formas de EF mais praticadas mundialmente, sendo que nos Estados Unidos da América é a segunda modalidade de exercício dinâmico mais popular, perdendo apenas para as caminhadas^{64,65}. Com a finalidade de compreender seus efeitos, têm sido realizados estudos pré-clínicos com o EF de natação em roedores¹⁸.

Além dos objetivos desportivos-competitivos, a natação também tem sido utilizada para fins terapêuticos, como na recuperação de hipotrofias musculares, no tratamento de problemas respiratórios, bem como durante o processo de recuperação de lesões, tornando-se, portanto, uma forma atrativa de EF. Associado a isto, a natação também apresenta uma acessibilidade facilitada, envolvendo indivíduos em diferentes condições físicas e clínicas, visto que a descarga de peso corporal é significativamente diminuída, ocasionando menor impacto sobre o sistema musculoesquelético e minimizando o índice de lesões^{66,67}. Todavia, surpreendentemente, pouco se sabe acerca dos efeitos induzidos pela natação regular sobre a promoção da saúde e prevenção de doenças⁶⁸.

Quando se trata da prática de EF, alguns parâmetros de treinamento determinam a adaptação ao treino e devem ser levados em consideração, tais como: a intensidade, a frequência, a duração e o tipo de exercício. A intensidade refere-se ao nível de dificuldade do exercício; a frequência, ao número de sessões; e a duração, ao período de tempo durante o qual o indivíduo esteve em treinamento, ou à duração de cada sessão de EF^{62,69}.

De forma geral, há três métodos usados para orientar e/ou designar a intensidade do EF: frequência cardíaca, concentrações de lactato sanguíneo e ritmo/velocidade do treinamento⁶⁹. Em relação aos exercícios de alta intensidade, observa-se que os estoques de glicogênio muscular são quebrados rapidamente, havendo, com isso, alta formação de lactato, do qual parte se difunde para fora das fibras musculares, onde ele é produzido, aumentando assim a concentração na corrente sanguínea. Dessa forma, o acúmulo de lactato no sangue é, em grande parte, um reflexo da ativação das fibras musculares nas quais a capacidade glicolítica excede a capacidade do metabolismo oxidativo do piruvato⁶².

Relatos na literatura demonstram que o EF auxilia no controle de algumas condições dolorosas⁷⁰, sendo assim, protocolos de exercício são usados na reabilitação de pacientes com diferentes doenças musculoesqueléticas crônicas^{70,71}. Associado a isto, Koltyn (2000) relatou que uma sessão de exercício altera a percepção dolorosa, tanto durante quanto após a realização do EF⁷².

Nesse sentido, há vários estudos envolvendo o EF que demonstraram alívio da dor, porém, há controvérsias em relação à intensidade de EF necessária para alcançar esse efeito. Segundo Raichlen e colaboradores (2012), os seres humanos relatam inúmeras recompensas neurobiológicas após atividade aeróbia moderada e intensa²⁵. Já em modelos animais, pesquisas demonstram que há redução da dor utilizando exercício de baixa intensidade⁷³, alta intensidade^{7,18}; havendo, ainda, estudos que não descrevem a intensidade utilizada, porém relatam o mesmo efeito²³.

Diante disso, observa-se que o EF apresenta efeito sobre a sensação dolorosa, contudo, a intensidade utilizada nos estudos está relacionada com o modelo utilizado e os objetivos estudados.

1.1.5 Sistemas endógenos de controle da dor

A modulação endógena da dor pode ser definida como as adaptações do corpo a informações nociceptivas momentâneas, bem como a longo prazo. Esse conceito se aproxima muito da definição de homeostase proposta por William Cannon, em 1929, “[...] como a capacidade de um sistema vivo em regular o seu ambiente interno mantendo uma condição constante estável”⁷⁴.

Historicamente, a modulação endógena da dor tem sido vista como a atenuação da transmissão no CPME por estímulos descendentes inibitórios

provenientes do encéfalo. Por essa via, a teoria do “portão da dor”, de Melzack e Wall, lançou esta ideia em 1965⁴². Atualmente está bem definido que a modulação endógena da dor pode ocorrer em todos os níveis do sistema nervoso (Figura 3), a saber, periféricamente, em receptores localizados em terminais nervosos; na medula espinal, em especial no CPME; ou em sítios supraespinais, especificamente no bulbo ventromedial rostral, formação reticular e substância cinzenta periaquedutal (PAG)⁷⁵.

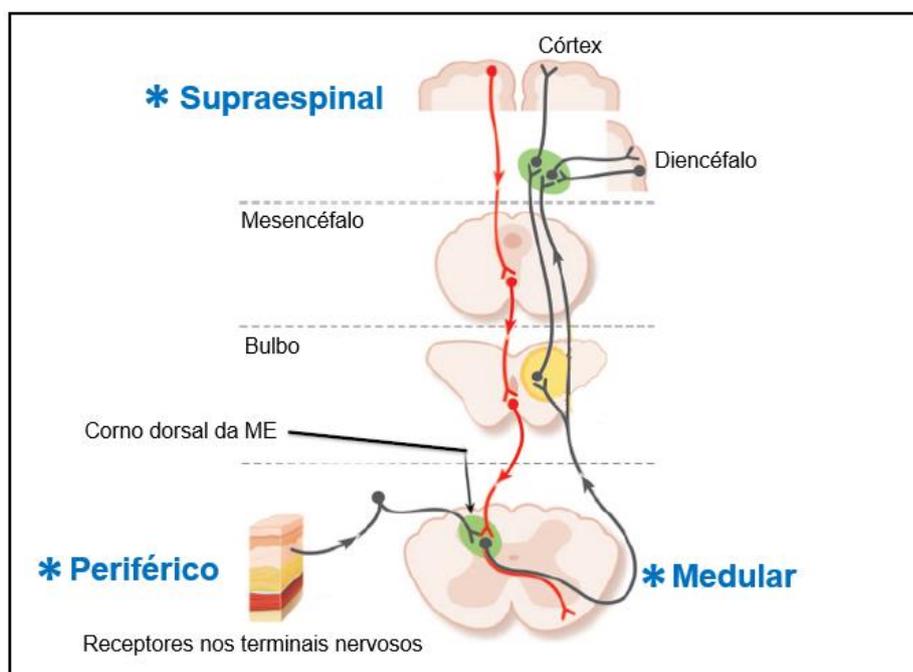


Figura 3 – Modulação endógena da dor. Este processo pode ocorrer em todos os níveis do sistema nervoso: a nível periférico, em receptores localizados em terminais nervosos; na medula espinal, em especial no corno posterior da medula espinal; ou em sítios supraespinais. *ME: Medula espinal. Fonte: adaptada de Al-Hasani e Bruchas (2011)⁷⁶.

Conforme descrito anteriormente, em terminais nociceptivos periféricos, diversos mediadores endógenos com efeitos pró ou antinociceptivos podem ser liberados por células locais lesionadas, células do sistema imune ativadas e, até mesmo, pelos queratinócitos da pele. Dentre os mediadores que possuem efeito pró-nociceptivo está o PAF, as PGs, a bradicinina e as citocinas pró-inflamatórias⁷⁷. Em contrapartida, existem também vários mediadores com efeito antinociceptivo, dentre os quais se destacam as endorfinas, a adenosina, os ECBs e as citocinas anti-inflamatórias, que contribuem para o equilíbrio dinâmico que existe entre a facilitação e a inibição da dor, tanto no SNP quanto no SNC^{6,78}.

1.1.5.1 Sistema ECB

O sistema ECB é composto por receptores CBs e por seus ligantes endógenos, sendo estes distribuídos entre as principais vias de modulação da dor do sistema nervoso, incluindo o encéfalo, a medula espinal e os neurônios sensoriais periféricos⁶. Tem sido bem estabelecido que os ECBs afetam a percepção da dor em sítios supraespinal, espinal e periférico⁹.

Historicamente, a maconha ou *Cannabis sativa*, um fitocanabinoide, tem sido utilizada para fins recreativos e tem a distinção de ser a droga com o maior registro histórico de uso humano⁷⁹. Enquanto a maconha é ilicitamente utilizada para fins recreativos, os extratos da planta têm sido utilizados desde os tempos antigos pelo seu valor medicinal e por suas propriedades psicoativas. Além disso, os ECBs são analgésicos bem conhecidos, especialmente no que se refere ao controle da dor de origem somática⁸⁰.

Nos últimos anos, os ECBs têm surgido como uma opção interessante para a terapia com opioides em estados de dor crônica⁶. Todavia, em humanos, a ativação de receptores CBs está associada a efeitos psicotrópicos indesejados, como a dependência, a tolerância e a deterioração da memória, as quais surgem devido ao efeito dos ECBs nos circuitos prosencefálicos⁸¹. Na exploração clínica das propriedades analgésicas dos ECBs, um grande desafio é conceber estratégias que possam reduzir ou eliminar seus efeitos adversos sobre os aspectos cognitivo, afetivo e funções motoras, sem afetar seus efeitos analgésicos⁷⁹.

Os ECBs são moléculas endógenas de sinalização lipídica, formados na membrana celular por meio de precursores fosfolipídicos. Essas moléculas possuem propriedades canabiméticas, pois se ligam e ativam um ou mais subtipos de receptores CBs^{6,21}. Recentemente, o sistema de sinalização ECB foi foco de pesquisas médicas, sendo considerado um potencial alvo terapêutico, visto que os ECBs mimetizam as ações farmacológicas do princípio psicoativo da maconha, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), e estão envolvidos em diferentes funções fisiológicas e patológicas, dentre elas: a regulação da ingestão alimentar, a imunomodulação, a inflamação e a analgesia^{81,82}.

Ao contrário dos neurotransmissores clássicos, os ECBs não são pré-formados e armazenados em vesículas, em vez disso, são produzidos "sob demanda", em resposta a um estímulo externo. Assim, uma similaridade estrutural entre os ECBs é

a sua natureza lipídica, sendo constituídos por uma cadeia de ácido graxo poli-insaturado derivado do ácido araquidônico e um grupamento polar, que pode ser a etanolamina – no caso da AEA – ou glicerol – no caso do 2-AG. Apesar da similaridade, os dois ECBs melhor caracterizados até o momento são produzidos por vias biossintéticas distintas, ainda que não totalmente independentes⁸³.

Nesse contexto, a AEA é formada por ação de uma fosfolipase D (PLD) seletiva para a N-araquidonil fosfatidil etanolamina (NAPE), sendo conhecida como NAPE-PLD²¹ (Figura 4). Alternativamente, a NAPE pode ser degradada pela α,β -hidrolase 4 (ABHD4), produzindo AEA glicerofosfato (GP-AEA), ou pela fosfolipase C (NAPE-PLC), produzindo AEA fosfato (P-AEA). Ambas são consideradas intermediárias, sendo assim, a GP-AEA é hidrolisada pela ação da glicerofosfodiesterase-1 (GDE-1), produzindo AEA, enquanto que a P-AEA é hidrolisada pela fosfatase (P-ase), também produzindo AEA. Seguindo a sinalização através de receptores CBs, a AEA sofre recaptação pela célula, sendo transportada intracelularmente por um transportador de membrana para AEA (ANT). No interior da célula, a AEA é degradada pela FAAH, produzindo etanolamina e ácido araquidônico^{84,85} (Figura 4).

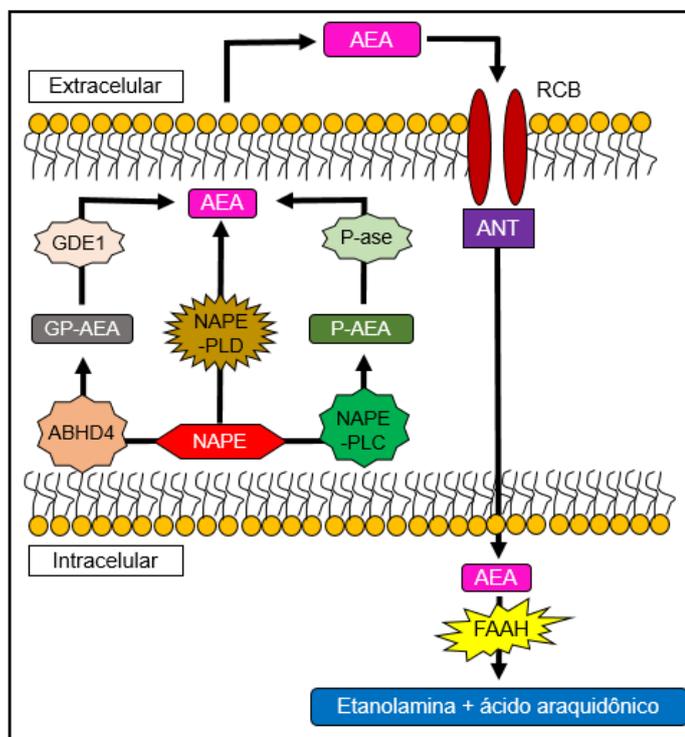


Figura 4 – Síntese e degradação da Anandamida. *AEA: anandamida; NAPE: N-araquidonil fosfatidil etanolamina; PLD: fosfolipase D; ABHD4: α,β -hidrolase 4; PLC: fosfolipase C; GP-AEA: anandamida glicerofosfato; P-AEA: anandamida fosfato; GDE1: glicerofosfodiesterase 1; P-ase: fosfatase; ANT: transportador de membrana para anandamida; FAAH: amido-hidrolase de ácidos graxos; RCB: Receptor canabinoide.

Fonte: adaptada de Mcdougall (2009)⁸⁶.

Em relação ao 2-AG, este também é produzido pela hidrólise de precursores derivados do metabolismo fosfolipídico (sn1-acil-2-AG). Isto porque há duas enzimas-chave, duas diacilglicerol lipases (DAGL- α e DAGL- β), pertencentes à família das serinas lipases. Essas enzimas, assim como a NAPE-PLD, são sensíveis ao cálcio (Ca^{2+}), sendo este um estímulo fisiológico para a síntese dos ECBs. Seguindo a sinalização do receptor CB, o 2-AG é transportado para dentro da célula por um transportador de 2-AG (2-AGT) e é degradado pela MAGL, produzindo ácido araquidônico e glicerol^{84,85} (Figura 5).

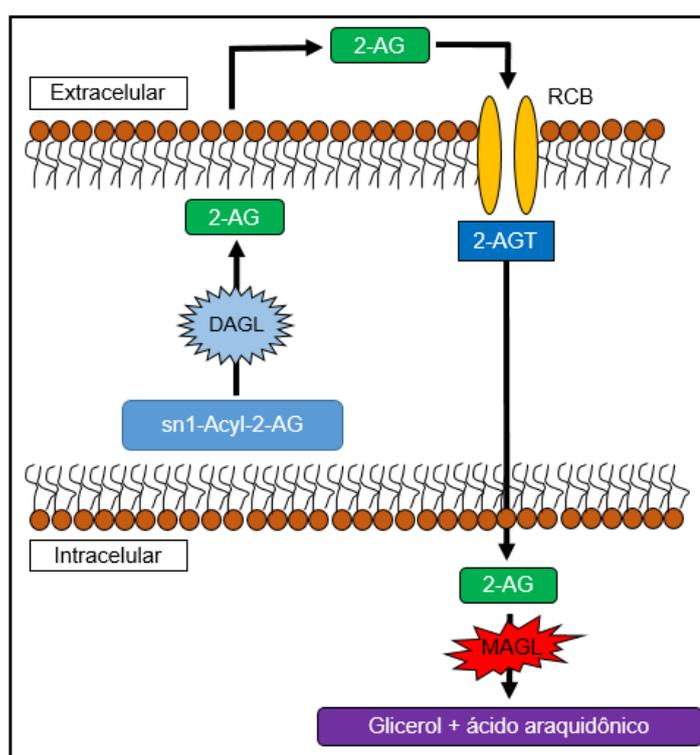


Figura 5 – Síntese e degradação do 2-AG. *sn1-acyl-2-AG: sn1-acil-2-araquidonil glicerol; DAGL: diacil glicerol lipase; 2-AG: 2-araquidonilglicerol; MAGL: monoacilglicerol lipase. Fonte: adaptada de Mcdougall (2009)⁸⁶.

1.1.5.2 Receptores CBs e dor

A família dos receptores CBs, no momento, inclui dois receptores distintos: o receptor CB₁, predominantemente encontrado no encéfalo e em outros tecidos do sistema nervoso, e o receptor CB₂, encontrado principalmente no sistema imunológico, mas também expresso em menor densidade no encéfalo⁸⁷. Esses receptores regulam uma variedade de funções fisiológicas centrais e periféricas, incluindo o desenvolvimento neuronal, os processos neuromoduladores, o

metabolismo energético, as funções cardiovasculares, respiratórias e reprodutivas, bem como a modulação da proliferação, a mobilidade, a adesão e a apoptose de células⁸⁸.

Como membros da superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), os receptores CBs exercem seus efeitos biológicos por meio da ativação de proteínas heterotriméricas do tipo $G_{i/o}$. Dessa forma, como consequência desse acoplamento preferencial, a ativação desses receptores leva à inibição da adenilato ciclase (AC) e reduções nas concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e de proteínas cinases A (PKA), na maioria dos tecidos (Figura 6). Além disso, ambos os receptores CBs regulam a fosforilação e a ativação de diferentes membros da família de cinases ativadas por mitógenos (MAPK)⁸.

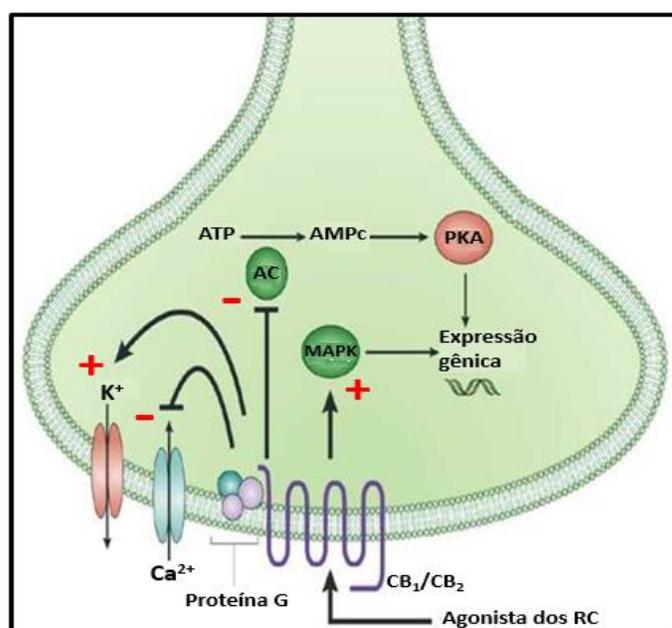


Figura 6 – Receptores canabinoides (CB). *AC: adenilato ciclase; ATP: adenosina trifosfato; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; PKA: proteína cinase A; MAPK: proteína cinase ativada por mitógenos; Ca^{2+} : cálcio; K^+ : potássio; CB₁: canabinoide 1; CB₂: canabinoide 2; Sinal “+” = ativação; Sinal “-” = inibição.

Fonte: adaptada de Spigelman (2010)⁸⁹.

O receptor CB₁ é, na verdade, o GPCR mais abundante no SNC, expresso em concentrações elevadas no hipocampo, no córtex, no cerebelo e nos núcleos da base⁹⁰. A ativação desses receptores leva à inibição da AC, ao bloqueio de vários canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem⁹¹, e a ativação de vários canais de K^+ . Além disso, os receptores CB₁ centrais também estão localizados em regiões envolvidas na transmissão e modulação da dor, especificamente no CPME e na PAG⁹².

No SNP, os receptores CB₁ foram encontrados no gânglio sensorial dos nervos espinais de tamanhos heterogêneos, com graus variáveis de RNAm do receptor CB₁ e de proteínas em diferentes subtipos de neurônios sensoriais. Assim, fora demonstrado que há uma localização predominante de receptor CB₁ em neurônios de grande diâmetro⁹³, bem como expressão desses receptores principalmente em neurônios nociceptivos de pequeno diâmetro⁹⁴. Um fluxo axoplasmático (anterógrado) desse receptor CB₁ tem sido demonstrado em axônios sensoriais periféricos, implicando no transporte desse receptor para os terminais periféricos onde se presume que os CBs produzam seus efeitos antinociceptivos⁹⁵.

Do mesmo modo que o receptor CB₁, o receptor CB₂ é capaz de modular a atividade da AC e MAPK, por meio da ativação de proteínas G_i. No entanto, em contraste com os receptores CB₁, a ativação de receptores CB₂ não modula a função de canais iônicos⁹⁶. Esses receptores estão presentes principalmente no sistema imunológico, um nível de expressão muito mais elevado do que os receptores CB₁⁹⁷. Até recentemente, pensava-se que os receptores CB₂ não estavam constitutivamente presentes no encéfalo, no entanto, foi demonstrada a presença deles em células da microglia encefálica e em neurônios em diversas regiões do encéfalo, incluindo o cerebelo, tronco encefálico, PAG, tálamo, *striatum*, córtex, amígdala e hipocampo⁹⁸⁻¹⁰¹. Ainda, os receptores CB₂ estão presentes também na pele e na medula espinal^{102,103}.

1.1.5.3 EF e sistema ECB

Reconhecido como um "modificador da doença", o EF tem sido considerado como um método mais econômico para a prevenção e o tratamento de doenças humanas. Além disso, a visão tradicional de que o EF envolve a liberação de monoaminas e endorfinas tem sido desafiada pela descoberta do sistema ECB, havendo evidências de que esse sistema possa estar envolvido com alguns dos efeitos desencadeados pelo EF¹⁰⁴.

Ademais, recentemente, surgiram evidências de que o EF induz alguns dos efeitos psicotrópicos provocados pela *Cannabis sativa*, tais como a felicidade e a euforia, reforçando a hipótese de que os ECBs possam mediar, pelo menos em parte, os efeitos centrais e periféricos do EF¹⁰⁴.

A primeira evidência de que o EF ativa o sistema ECB fora realizada por Sparling e colaboradores (2003). Nessa pesquisa, envolvendo estudantes universitários submetidos ao exercício de intensidade moderada (esteira ou bicicleta ergométrica), os autores observaram um aumento das concentrações de AEA na circulação sistêmica, sugerindo um novo mecanismo para a AIEF¹⁰⁵. Após esta investigação, outros estudos, envolvendo humanos, têm corroborado essa afirmação^{22,106}.

Além disso, há evidências de que indivíduos, após a realização de EF, relatam diferentes respostas neurobiológicas, dentre elas: a sensação de bem-estar, a diminuição da ansiedade, a sedação e a redução ou alívio da dor¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Outros autores, em estudos realizados com animais e humanos, sugerem que o sistema ECB também está implicado nessas respostas induzidas pelo EF^{25,105,110}.

Aliado a isto, estudos sugerem que os ECBs estejam, efetivamente, envolvidos na atenuação da dor aguda e crônica, tanto a nível central quanto a nível periférico, conseqüentemente, esse sistema desempenha papel importante na AIEF¹¹¹⁻¹¹⁶.

Por essa via, Fuss e colaboradores (2015), em um estudo envolvendo camundongos C57BL/6J e C57BL/6N, submetidos à roda de corrida, observaram menor ansiedade, menor atividade (sedação) e redução na sensibilidade térmica à dor nos animais exercitados. Além disso, esses autores demonstraram aumento das concentrações plasmáticas de ECBs no grupo dos animais exercitados²³.

Com base nisso, observa-se que a corrida aguda de longa distância reduz o comportamento de ansiedade, promovendo analgesia e sedação nos camundongos. Isto porque a redução do comportamento de ansiedade após a corrida aguda de longa duração depende de receptores CB₁ expressos em neurônios gabaérgicos. Todavia, a redução da dor também depende da ativação de receptores CB₁ e CB₂ periféricos²³.

Nesse contexto, Galdino e colaboradores (2014a), utilizando ratos *Wistar* submetidos a um protocolo de exercício de resistência, observaram que o sistema ECB está envolvido sistemicamente e centralmente no efeito anti-hiperalgésico induzido pelo exercício de resistência. Além disso, fora demonstrado que o exercício de resistência aumentou a expressão de receptores CB₁ no cérebro de ratos, ativou esses receptores na PAG e aumentou as concentrações plasmáticas de ECBs¹².

Em outro estudo publicado por Galdino e colaboradores (2014b), por meio de pesquisa realizada com ratos *Wistar*, fora observado que o pré-tratamento sistêmico e central com antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂ (AM251 e AM630,

respectivamente) preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo exercício aeróbico em esteira num protocolo de testes nociceptivos mecânico e térmico. Ademais, observaram aumento da expressão de receptores CB₁ no encéfalo de ratos após o exercício, ativação desses receptores na PAG, bem como aumento das concentrações plasmáticas de ECBs no grupo submetido ao exercício aeróbico, quando comparado com o grupo-controle. Dessa forma, os autores concluem que uma única sessão de exercício aeróbico de intensidade moderada produz efeito anti-hiperalgésico, sendo este mediado por ECBs, atuando em receptores CB₁ e CB₂ nos níveis periférico, espinal e supraespinal¹³.

Outro ponto em questão diz respeito à intensidade do exercício. Nesse sentido, Raichlen e colaboradores (2012) demonstraram em humanos e cães submetidos ao exercício aeróbico em esteira um aumento da sinalização dos ECBs após EF de intensidade moderada, sugerindo que essa resposta não é simplesmente desencadeada pela locomoção, mas está vinculada à intensidade do EF²⁵. Heyman e colaboradores (2012), por sua vez, verificaram que, em jovens ciclistas treinados, houve aumento nas concentrações de AEA, mas não de 2-AG, após EF, utilizando 55% e 75% da potência máxima durante o ciclismo. Entretanto, os autores concluem que quanto mais intenso for o exercício, maior é o aumento nas concentrações de AEA²⁴.

Apesar de haver diferentes propósitos quanto à utilização do exercício, é indiscutível que ele pode influenciar a percepção dolorosa. Nesse sentido, dados disponíveis na literatura permanecem controversos em relação aos possíveis mecanismos de ação da AIEF. Com base nisso, torna-se necessário confirmar os dados relatados na literatura sobre o envolvimento do sistema ECB na AIEF. Ainda, é importante destacar que os estudos citados foram realizados com animais saudáveis, não apresentando qualquer condição dolorosa. Assim, torna-se necessário verificar se a natação também pode induzir a liberação de ECBs em um modelo de inflamação periférica que mimetize condições inflamatórias crônicas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação do sistema ECB no efeito anti-inflamatório da natação de alta intensidade em um modelo animal de inflamação crônica periférica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito de sessões diárias de natação sobre a hipernocicepção mecânica;
- Determinar o efeito de sessões diárias de natação sobre o edema de pata;
- Verificar a contribuição dos receptores CB₁, presentes em diferentes sítios das vias de modulação da dor, sobre o efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade;
- Identificar a contribuição dos receptores CB₂, presentes em diferentes sítios das vias de modulação da dor, sobre o efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade;
- Investigar a possível participação das enzimas de degradação dos ECBs na ação hiponociceptiva induzida pela natação.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

A pesquisa se caracteriza por ser pré-clínica e experimental, de natureza quantitativa.

3.2 FÁRMACOS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas: adjuvante completo de Freud (CFA) de Sigma (St. Louis, Missouri, USA); AM281, um antagonista seletivo para receptores CB₁; AM630, um antagonista seletivo para receptores CB₂; URB937, um inibidor da FAAH; e JZL184, um potente e seletivo inibidor da MAGL. Todos os fármacos foram obtidos da Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA). Além disso, todos os fármacos foram dissolvidos, somente antes do uso, em dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), em quantidades que não excederam uma concentração final de 1% e 2,5%, respectivamente. As doses de todas as substâncias usadas foram selecionadas com base na literatura^{7,117-120} e em experimentos prévios, conduzidos em nosso laboratório. Quando os antagonistas foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), um volume de 10ml/kg foi injetado. Nas administrações intraplantar (i.pl.) e intratecal (i.t.), volumes constantes de 20µl e 5µl foram injetados, respectivamente.

3.3 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos utilizando camundongos *Swiss* machos (25 a 35g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – os quais foram mantidos no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx), da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL –, em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16cm), com grades de aço inox e armazenados conforme as normas do laboratório. Foram mantidos 15 animais por caixa, os quais permaneceram em ambiente aclimatado a 22±2°C, no ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 6h:00min), com acesso à ração e água *ad libitum*. Os animais foram homoganeamente

distribuídos entre os grupos e aclimatizados no laboratório por, pelo menos, 1 hora antes dos testes, e foram usados somente uma vez em cada experimento.

A previsão do número de animais nessa pesquisa foi baseada em Daniel (2008)¹²¹, que coloca uma equação utilizada para a determinação do tamanho de uma amostra sem reposição, sendo que a utilização do desvio padrão obtido na fórmula aponta para $n = 8$ animais por grupo, utilizando um intervalo de confiança de 95%.

3.3.1 Grupos experimentais

Para cada experimento realizado, os animais foram distribuídos da seguinte forma:

- **Experimento 1 – Efeito hiponociceptivo da natação:** Os animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homoganeamente distribuídos em 2 grupos: animais não exercitados e animais exercitados, sendo mensurada a hipernocicepção mecânica. Total: 16 animais.
- **Experimento 2 – Mensuração da espessura do edema de pata:** Os animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homoganeamente distribuídos em 2 grupos: animais não exercitados e animais exercitados, sendo mensurada a espessura da pata. Total: 16 animais.
- **Experimento 3 – Envolvimento dos receptores CB₁ sistêmicos no efeito hiponociceptivo da natação:** Novos grupos de animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homoganeamente distribuídos em 2 grupos: CFA + Não exercitado; CFA + Exercitado. Total: 16 animais. Vale ressaltar que a administração do antagonista AM281 pela via i.p. ocorreu nos dias 3, 4 e 5 da natação, sendo adotada essa conduta a fim de reduzir os grupos experimentais sem alterar a fidedignidade dos resultados e, conseqüentemente, reduzir o número total de animais neste estudo, estando de acordo com o que preconiza o Princípio Humanitário da Experimentação Animal no que diz respeito à redução no número de animais para experimentação.

- **Experimento 4 – Envolvimento dos receptores CB₁ periféricos no efeito hiponociceptivo da natação:** Outros animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homoganeamente distribuídos em 2 grupos: CFA + Não exercitado; CFA + Exercitado. Posteriormente, esses animais foram submetidos a administração i.pl. de AM281 do 3º ao 5º dia da natação. Total: 16 animais.
- **Experimento 5 – Envolvimento dos receptores CB₁ espinais no efeito hiponociceptivo da natação:** Outros animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homoganeamente distribuídos em 2 grupos: CFA + Não exercitado; CFA + Exercitado. Subsequentemente, esses animais receberam a administração de AM281, por via i.t., nos dias 3, 4 e 5 da natação. Total: 16 animais.
- **Experimento 6 – Envolvimento dos receptores CB₂ sistêmicos no efeito hiponociceptivo da natação:** Novos animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homoganeamente distribuídos em 2 grupos: CFA + Não exercitado; CFA + Exercitado. Em seguida, esses animais foram submetidos a administração i.p. de AM630 do 3º ao 5º dia da natação. Total: 16 animais.
- **Experimento 7 – Envolvimento dos receptores CB₂ periféricos no efeito hiponociceptivo da natação:** Os animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homoganeamente distribuídos em 2 grupos: CFA + Não exercitado; CFA + Exercitado. Após, esses animais receberam a administração de AM630, por via i.pl., nos dias 3, 4 e 5 da natação. Total: 16 animais.
- **Experimento 8 – Envolvimento dos receptores CB₂ espinais no efeito hiponociceptivo da natação:** Os animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homoganeamente distribuídos em 2 grupos: CFA + Não exercitado; CFA + Exercitado. Posteriormente, esses animais receberam a administração i.t. de AM630 do 3º ao 5º dia da natação. Total: 16 animais.
- **Experimento 9 – Contribuição da inibição da degradação da AEA para o mecanismo hiponociceptivo da natação:** Novos grupos de animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homoganeamente distribuídos

em 4 grupos: CFA + Não exercitado; CFA + Exercitado; CFA + URB937 + Não exercitado; CFA + URB937 + Exercitado. A administração de URB937 foi por via i.p. e ocorreu no terceiro dia da natação. Total: 32 animais.

- **Experimento 10 – Contribuição da inibição da degradação do 2-AG para o mecanismo hiponociceptivo da natação:** Novos animais foram submetidos à injeção i.pl. de CFA e, em seguida, homogeneamente distribuídos em 4 grupos: CFA + Não exercitado; CFA + Exercitado; CFA + JZL184 + Não exercitado; CFA + JZL184 + Exercitado. A administração de JZL184 foi por via i.p. e ocorreu no terceiro dia da natação. Total: 32 animais.

3.4 PROTOCOLO DE NATAÇÃO

O protocolo de natação (EF) utilizado neste estudo foi adaptado de Mazzardo-Martins e colaboradores (2010)¹⁸, sendo assim, os animais foram colocados em uma caixa plástica, medindo 540 x 390 x 325mm, dividida com acrílico, em oito compartimentos de 170 x 110mm cada (Figura 7A-B), contendo aproximadamente 35 litros de água a 35°C. Sabão líquido foi acrescentado na quantidade de 1ml por compartimento (totalizando 8ml), reduzindo dessa forma a tensão superficial da água e evitando que os animais pudessem boiar. Após cada sessão de natação, os animais foram gentilmente colocados em maravalha limpa para facilitar a secagem do corpo.

De acordo com o protocolo proposto por Mazzardo-Martins e colaboradores (2010)¹⁸, os animais realizavam 2 dias de adaptação seguido por 5 dias de natação propriamente dita. No presente estudo, os animais do grupo-controle (não exercitado) foram submetidos diariamente à natação, com duração de 30s, enquanto que os animais do grupo exercitado foram submetidos a um período de habituação composto por 4 dias, sendo assim, no primeiro dia, os camundongos realizaram a natação por 30s (duas vezes). No segundo dia, foram realizadas duas sessões de natação por 2min. No terceiro e no quarto dia, fora realizada uma sessão de natação por 5min. Finalizado este período de habituação, os animais foram submetidos à natação propriamente dita, sendo assim, no primeiro dia os animais nadaram 30min, em 3 séries de 10min, com 5min de repouso e, no segundo dia, os animais nadaram 30min, em 2 séries de 15min, com 5min de repouso. Do terceiro ao sétimo dia, os camundongos foram submetidos à natação por 30min, sem repouso (Figura 8, item

delineamento do estudo). Tal modificação foi adotada a fim de observar de forma coerente o possível efeito hiponociceptivo da natação, assim como o envolvimento do sistema ECB nesse efeito. Para tanto, foram realizados 2 dias de exercício, seguido por 3 dias de administração dos antagonistas previamente a natação (inibidor somente fora realizado uma única vez, sendo esta no terceiro dia) e, por fim, duas sessões de natação por si só.

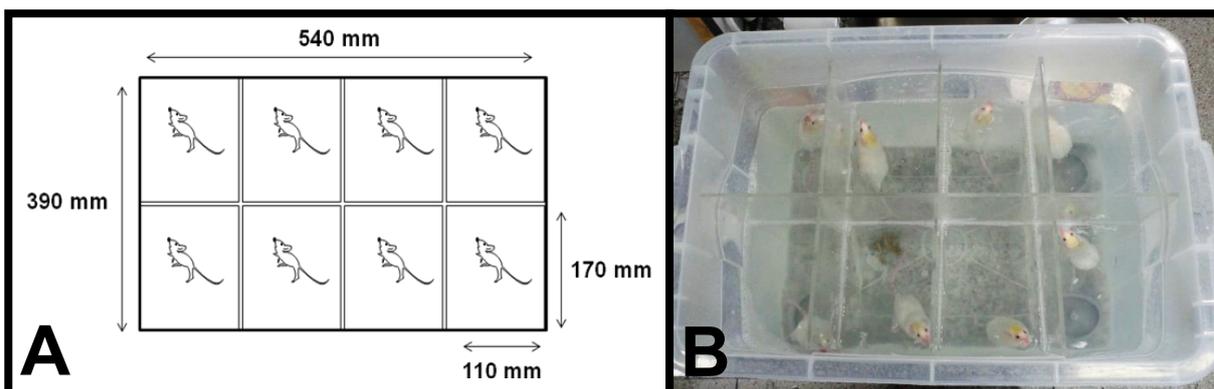


Figura 7 – Banheira para natação. Desenho ilustrativo quanto ao número de animais e às dimensões da caixa plástica utilizada no protocolo de natação do estudo (A). Fotografia representativa de camundongos durante uma sessão de natação na caixa plástica, em que os animais foram submetidos ao tratamento (B).

Fonte: adaptada de Mazzardo-Martins e colaboradores (2010)¹⁸.

3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Inicialmente, os animais foram submetidos ao protocolo de natação, como descrito anteriormente. No quarto dia de habituação (D0 na Figura 8), previamente ao EF, foi determinada a resposta sensorial basal dos animais por meio do teste de von Frey. Assim, após a habituação dos animais ao ambiente aquático, realizou-se a indução da inflamação crônica periférica, por meio da administração i.pl. do agente flogístico CFA.

Subsequentemente, os animais que apresentaram frequência de resposta acima de 60% foram randomicamente distribuídos em 2 grupos: não exercitados e exercitados. Após o período de habituação, do primeiro ao sétimo dia, os animais realizaram o exercício de natação propriamente dito, conforme descrito anteriormente, e a hipernocicepção mecânica foi diariamente avaliada 30min após cada sessão de natação (D1 – D7 na Figura 8).

Concluído esse primeiro passo, foi realizada a avaliação do efeito antiedematogênico da natação. Para tanto, novos grupos de animais foram submetidos ao mesmo protocolo de EF citado anteriormente e a espessura da pata foi avaliada diariamente 30min após cada sessão de natação (D1 – D7 na Figura 8).

Finalizada a caracterização dos efeitos da natação sobre a nocicepção mecânica e o edema ocasionados pelo CFA, realizaram-se as análises dos mecanismos de ação envolvidos na hiponocicepção mecânica da natação após administração i.pl. de CFA. Dessa forma, novos grupos de animais foram submetidos ao mesmo protocolo de EF citado anteriormente. Para verificar o envolvimento sistêmico (i.p.) e local (i.pl. ou i.t.) dos receptores CB₁, no efeito hiponociceptivo da natação, o antagonista AM281 foi administrado em diferentes sítios e concentrações (D3 – D5 na Figura 8). Da mesma forma, a fim de investigar a participação dos receptores CB₂ nesse mesmo efeito, utilizou-se o antagonista AM630 por via i.p., ipl. e i.t. (D3 – D5 na Figura 8). E, por fim, para analisar a participação das enzimas de degradação dos ECBs no efeito hiponociceptivo da natação, foram utilizados inibidores enzimáticos como o URB937 e JZL184, inibidores das enzimas que degradam a AEA e o 2-AG, respectivamente, no terceiro dia da natação (D3 na Figura 8). Grupos de animais não exercitados também receberam antagonistas ou inibidores das enzimas, nas mesmas doses, sítios (sistêmico e local) e nos mesmos dias que os animais exercitados.

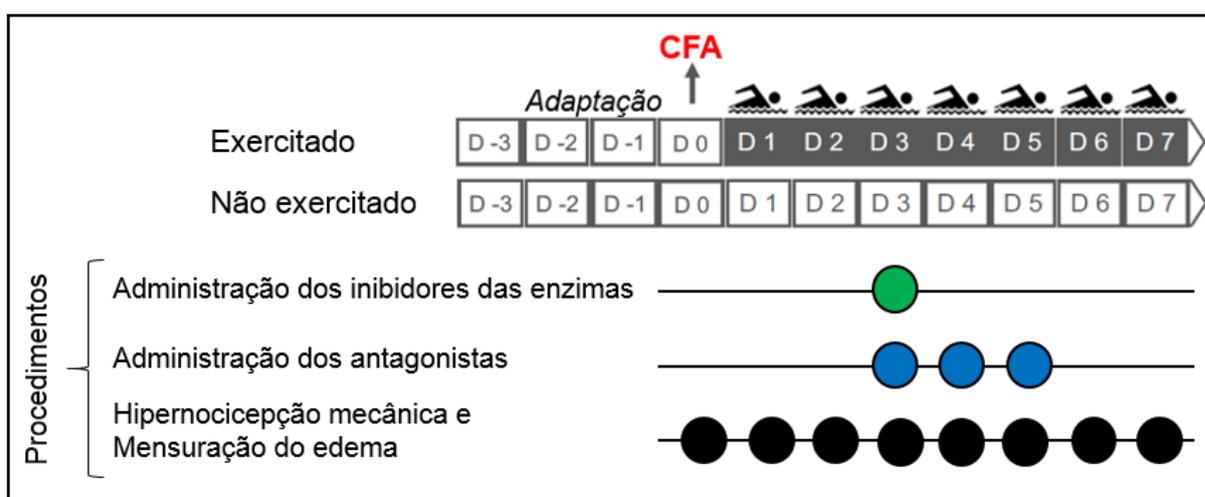


Figura 8 – Desenho experimental. Esquema ilustrativo referente ao protocolo de natação, avaliações comportamentais e administração de antagonistas ou inibidores das enzimas. CFA = Adjuvante completo de Freud; D = Dia.

Fonte: elaborada pela autora (2017).

3.6 MODELO ANIMAL DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA PERIFÉRICA E MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Nesta pesquisa foi utilizado o modelo animal de indução de inflamação periférica, por meio da injeção i.pl., contendo 20 μ l de solução de CFA a 80%. Esse modelo produz um estado de hipernocicepção mecânica persistente¹²².

O teste foi aplicado utilizando uma plataforma (70 x 40cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma⁴² (Figura 9A). A hipernocicepção mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de von Frey (0,4g). Dessa forma, a frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de von Frey foi registrada em porcentagem e utilizada como indicativo de resposta hipernociceptiva. Anteriormente à administração de CFA, os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal, sendo que apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta menor ou igual a 20% foram selecionados.

É importante registrar que o filamento foi aplicado na superfície plantar da pata posterior direita^{1,2}, atendendo a alguns critérios, como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; fora considerada resposta positiva o levantamento da pata posterior direita, na qual foi previamente administrado o CFA i.pl. (Figura 9B).

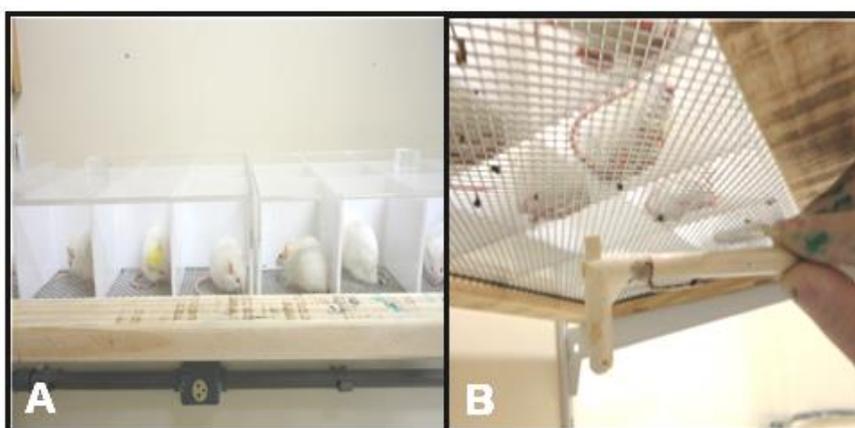


Figura 9 – Teste de von Frey. Câmara de observação (A). Aplicação do filamento de von Frey (B).
Fonte: arquivo da autora (2017).

3.6.1 Mensuração da espessura da pata

Para verificar o edema da pata, fora utilizado um micrômetro digital da marca *INSIZE*. O edema fora avaliado pré e pós-injeção de CFA na pata, assim como após a realização da natação (D0 – D7 na Figura 8). Além disso, as medidas foram realizadas em cada animal, pertencente a cada grupo, e foram expressas pela diferença do valor obtido entre a mensuração basal e as subsequentes¹²².

3.6.2 Investigação do papel do sistema ECB na hiponocicepção induzida pela natação de alta intensidade

3.6.2.1 Avaliação do envolvimento dos receptores CB₁ e CB₂ no efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade

Para verificar a participação sistêmica, periférica e espinal (central) dos receptores CB₁, no efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade, utilizou-se o antagonista AM281 em diferentes doses, de acordo com o sítio de administração, sendo assim, este foi aplicado 20min antes da natação, a fim de verificar o envolvimento sistêmico, e 15min antes, para o envolvimento periférico e espinal (Tabela 1). Esse procedimento foi realizado nos dias 3, 4 e 5 do protocolo de EF.

Além disso, com o intuito de avaliar o envolvimento sistêmico, periférico e espinal dos receptores CB₂, os camundongos foram pré-tratados com o antagonista AM630 nos dias 3, 4 e 5 do protocolo de EF, em diferentes sítios e concentrações, listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sítios e doses das administrações dos antagonistas para os receptores CB₁ e CB₂

Sítios de administração	RECEPTORES INVESTIGADOS	
	CB ₁	CB ₂
Sistêmico (intraperitoneal)	AM281 (0,5mg/kg, i.p.) ¹¹⁸	AM630 (3mg/kg, i.p.) ¹¹⁷
Periférico (pata)	AM281 (10µg/i.pl.) ¹¹⁹	AM630 (4µg/i.pl.) ¹¹⁹
Central (medula espinal)	AM281 (2µg/i.t.) ¹²⁰	AM630 (2µg/i.t.) ¹²⁰

Fonte: elaborada pela autora (2017).

3.6.2.2 Avaliação da participação das enzimas de degradação dos ECBs no efeito hiponociceptivo da natação

Para verificar o efeito da inibição da degradação de AEA sobre o efeito hiponociceptivo da natação, camundongos não exercitados e exercitados foram pré-tratados com o URB937 (0,1mg/kg, i.p.) 90min antes da natação¹²³. Da mesma forma, para investigar o efeito da inibição da degradação do 2-AG, os camundongos foram pré-tratados com o JZL184 (1,6mg/kg, i.p.) 90min antes da natação¹²⁴. Esse procedimento foi realizado no terceiro dia do protocolo de EF (D3 na Figura 8).

3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Nocicepção (dor) – número de retirada da pata frente ao estímulo mecânico (%)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Média e erro-padrão da média
Edema de pata – espessura da pata em μm	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Média e erro-padrão da média
Natação – protocolo de exercício físico (tratamento)	Independente	Quantitativa contínua de razão	Tempo (min)
Fármacos – AM281, AM630, URB937 e JZL184	Independente	Quantitativa contínua de razão	Massa (mg/kg)

Fonte: elaborado pela autora (2017).

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Primeiramente, os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, no qual fora verificado que os dados eram paramétricos. Nesse sentido, os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média (E.P.M.). As

comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste-*t*, Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguidas pelo teste de Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente. Em todas as análises, os valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0*.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL, com o protocolo número 14.005.4.08.IV. Além disso, todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e o guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes¹²⁵. O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram os mínimos necessários para demonstrar, de maneira consistente, o efeito ao tratamento recebido. Para realizar a morte indolor assistida (MIA) dos animais, estes receberam uma dose excessiva de anestésico (Pentobarbital, 80 mg/kg, i.p.), de acordo com a Resolução 1.000, de 12/05/2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), sob supervisão de médico veterinário responsável.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO HIPONOCICEPTIVO DA NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE

A injeção i.pl. de CFA produziu significativo ($P < 0,001$) desenvolvimento de hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral de camundongos injetados com CFA, do primeiro dia até o sétimo dia de avaliação. Todavia, os resultados descritos na Figura 10A demonstram que os camundongos submetidos à natação de alta intensidade apresentaram uma redução na frequência de resposta, quando comparados com o grupo-controle, em 0,5h (Inibição máxima [IM]: $88 \pm 6\%$) e 1h (IM: $51 \pm 10\%$) após o exercício.

A Figura 10B demonstra que camundongos submetidos à natação de alta intensidade, realizada diariamente, apresentaram redução da nocicepção 0,5h após o EF em todos os dias avaliados, comparando-os com o grupo-controle. Essa diminuição da hiperalgesia frente à estimulação mecânica foi de $88 \pm 6\%$ no primeiro dia, $66 \pm 9\%$ no segundo dia, $65 \pm 9\%$ no terceiro dia, $67 \pm 8\%$ no quarto dia, $62 \pm 10\%$ no quinto dia, $57 \pm 11\%$ no sexto dia e $71 \pm 8\%$ no sétimo dia.

No sétimo dia, ainda, foi observado que o efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade permaneceu significativo até 1h após a natação (Figura 10C). Dessa forma, observou-se uma mudança significativa no limiar sensorial mecânico dos animais, os quais apresentavam uma redução da frequência de retirada de $71 \pm 8\%$ após 0,5h e $46 \pm 14\%$ após 1h de natação.

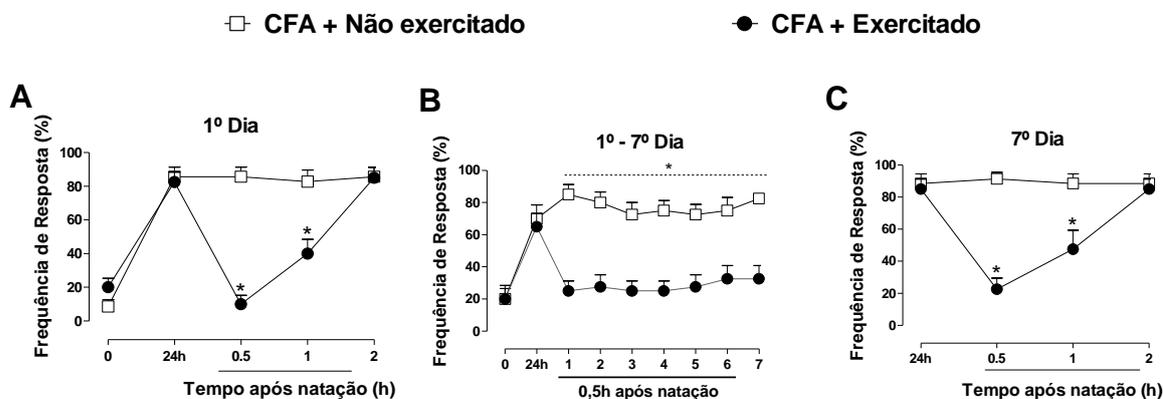


Figura 10 – Decurso temporal da hiponocicepção induzida pela natação no modelo de inflamação crônica periférica causada pelo CFA em camundongos. A: Avaliação da hiperalgesia mecânica em curso temporal no primeiro dia de natação; B: Avaliação da hiperalgesia mecânica, realizada diariamente, após 0,5h da natação; C: Avaliação da hiperalgesia mecânica em curso temporal no

sétimo dia de natação. Cada ponto representa a média de 8 animais, e as barras verticais indicam o Erro-Padrão da Média (E.P.M.). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado ao grupo não exercitado. $*P < 0.001$, ANOVA de duas vias seguida pelo teste Bonferroni.
Fonte: elaborada pela autora (2017).

4.2 EFEITO DA NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE O EDEMA DE PATA

Os resultados apresentados na Figura 11 demonstram que a injeção i.pl. de CFA produziu um aumento na espessura da pata em ambos os grupos. Todavia, os dados mostram que camundongos exercitados apresentaram uma redução significativa ($P < 0,05$) no edema de pata nos dias 1 (IM: $24 \pm 3\%$) e 2 (IM: $39 \pm 10\%$), quando comparado aos animais do grupo não exercitado.

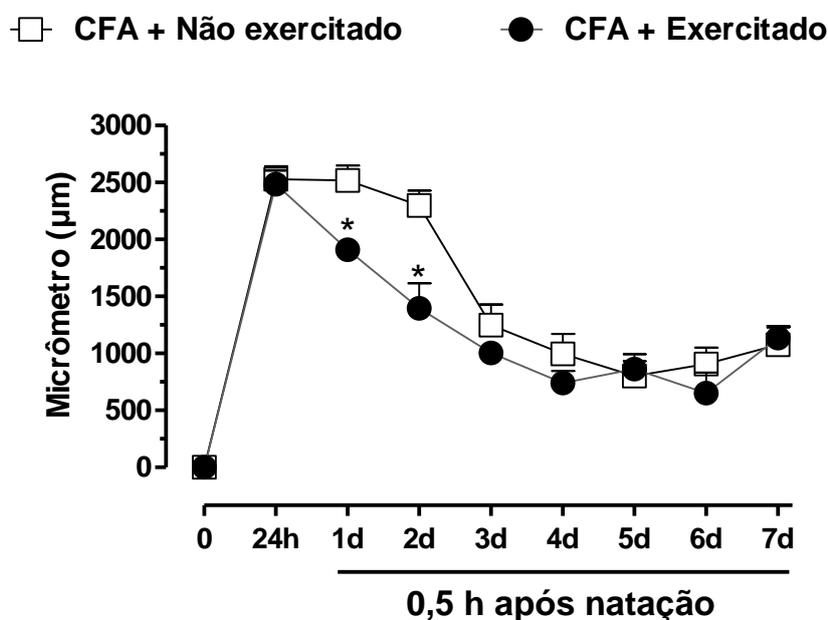


Figura 11 – Efeito antiedematogênico induzido pela natação no modelo de inflamação crônica periférica causada pelo CFA em camundongos. Cada ponto representa a média de 8 animais, e as barras verticais indicam o Erro-Padrão da Média (E.P.M.). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado ao grupo não exercitado. $*P < 0.05$, ANOVA de duas vias seguida pelo teste Bonferroni. d = dias.

Fonte: elaborada pela autora (2017).

4.3 EFEITO HIPONOCICEPTIVO DA NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE REQUER A ATIVAÇÃO DE RECEPTORES CB₁ E CB₂

Para verificar se o efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade poderia ser mediado via ativação de receptores CB₁ e CB₂, foram administrados antagonistas seletivos para esses receptores – AM281 e AM630, respectivamente –, em diferentes

sítios. A administração sistêmica, espinal e periférica de AM281 preveniu significativamente o efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade ($P < 0,001$) 0,5h após o exercício nos dias 3, 4 e 5, quando comparado com o grupo CFA + Não exercitado (Figura 12A-C).

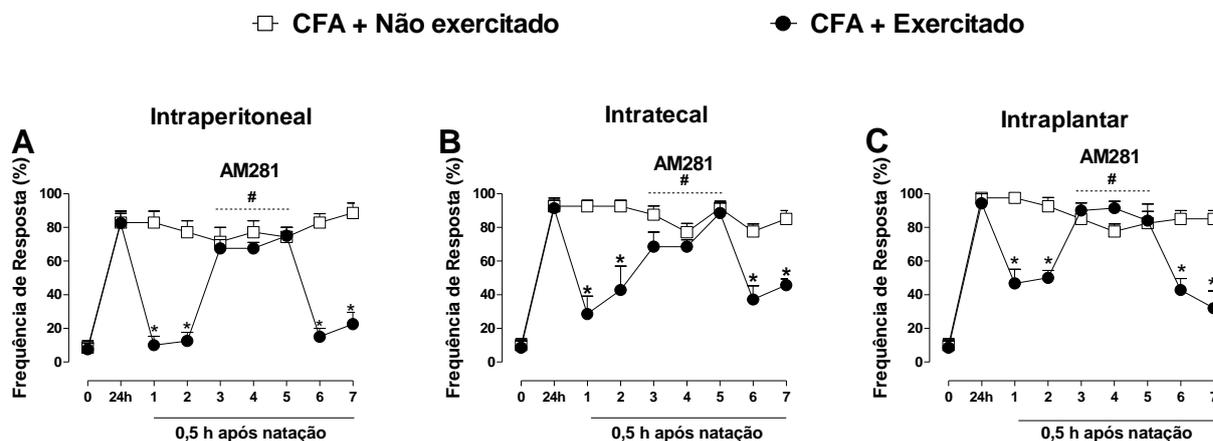


Figura 12 – Envolvimento dos receptores CB_1 no efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade, no modelo de inflamação crônica periférica induzida pelo CFA em camundongos. A: administração sistêmica de AM281 (0,5mg/kg, i.p.); B: administração espinal de AM281 (2 μ g/i.t.); C: administração periférica de AM281 (10 μ g/i.pl.). Cada ponto representa a média de 8 animais, e as barras verticais indicam o Erro-Padrão da Média (E.P.M.). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado ao grupo CFA + Não exercitado ($*P < 0,001$) e o sustentado representa a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ou a prevenção do efeito hiponociceptivo da natação na presença de AM281. ANOVA de duas vias seguida pelo teste Bonferroni.

Fonte: elaborada pela autora (2017).

Além disso, a administração sistêmica, espinal e periférica de AM630 também preveniu significativamente o efeito hiponociceptivo produzido pela natação de alta intensidade ($P < 0,001$) 0,5h após o exercício nos dias 3, 4 e 5, quando comparado com o grupo CFA + Não exercitado (Figura 13A-C).

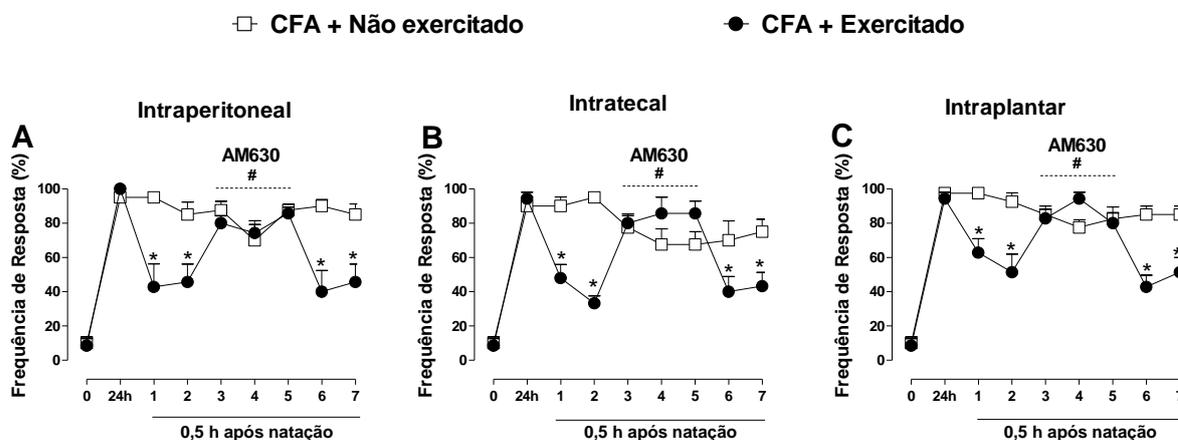


Figura 13 – Envolvimento dos receptores CB_2 no efeito hiponociceptivo da natação de alta intensidade, no modelo de inflamação crônica periférica induzida pelo CFA em camundongos. A: administração sistêmica de AM630 (3mg/kg, i.p.); B: administração espinal de AM630 (2 μ g/i.t.); C: administração

periférica de AM630 (4µg/i.pl.). Cada ponto representa a média de 8 animais, e as barras verticais indicam o Erro-Padrão da Média (E.P.M.). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado ao grupo CFA + Não exercitado ($*P < 0,001$) e o sustenido representa a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ou a prevenção do efeito hiponociceptivo da natação na presença de AM630. ANOVA de duas vias seguida pelo teste Bonferroni.
Fonte: elaborada pela autora (2017).

4.4 INIBIÇÃO DAS ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DOS ECBs CONTRIBUI PARA O MECANISMO DE AÇÃO HIPONOCICEPTIVA DA NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE

Para testar a hipótese da participação das enzimas de degradação dos ECBs no efeito hiponociceptivo induzido pela natação de alta intensidade, os animais foram pré-tratados com uma dose subefetiva dos inibidores das enzimas de degradação dos ECBs e, posteriormente, submetidos à natação. Assim, a natação de alta intensidade reduziu a hipernocicepção mecânica por um período de 1h em camundongos exercitados, comparados aos não exercitados (IM: $79 \pm 10\%$ em 0,5h e $60 \pm 7\%$ em 1h – Figura 14A; IM: $65 \pm 9\%$ em 0,5h e $40 \pm 10\%$ em 1h – Figura 14B).

Por sua vez, os camundongos submetidos à natação de alta intensidade, que foram pré-tratados com a dose subefetiva de URB937 (0,1mg/kg, i.p.) apresentaram um significativo prolongamento ($P < 0,001$) do efeito hiponociceptivo causado pela natação de alta intensidade, sendo que a hipernocicepção foi suprimida por até 3h ($P < 0,001$). Essa diminuição da hiperalgesia de forma mais prolongada foi de 46 ± 11 (2h) e $51 \pm 8\%$ (3h), comparando os grupos CFA + URB937 + Exercitado e CFA + Exercitado (Figura 14A).

É interessante registrar que os camundongos exercitados, pré-tratados com uma dose subefetiva de JZL184 (1,6mg/kg, i.p.), exibiram um significativo prolongamento ($P < 0,001$) do efeito hiponociceptivo produzido pela natação de alta intensidade, sendo esta suprimida por até 4h ($P < 0,001$). Essa diminuição da hiperalgesia de forma mais prolongada foi de 81 ± 7 (2h) e 40 ± 11 (4h), comparando os grupos CFA + JZL184 + Exercitado e CFA + Exercitado (Figura 14B).

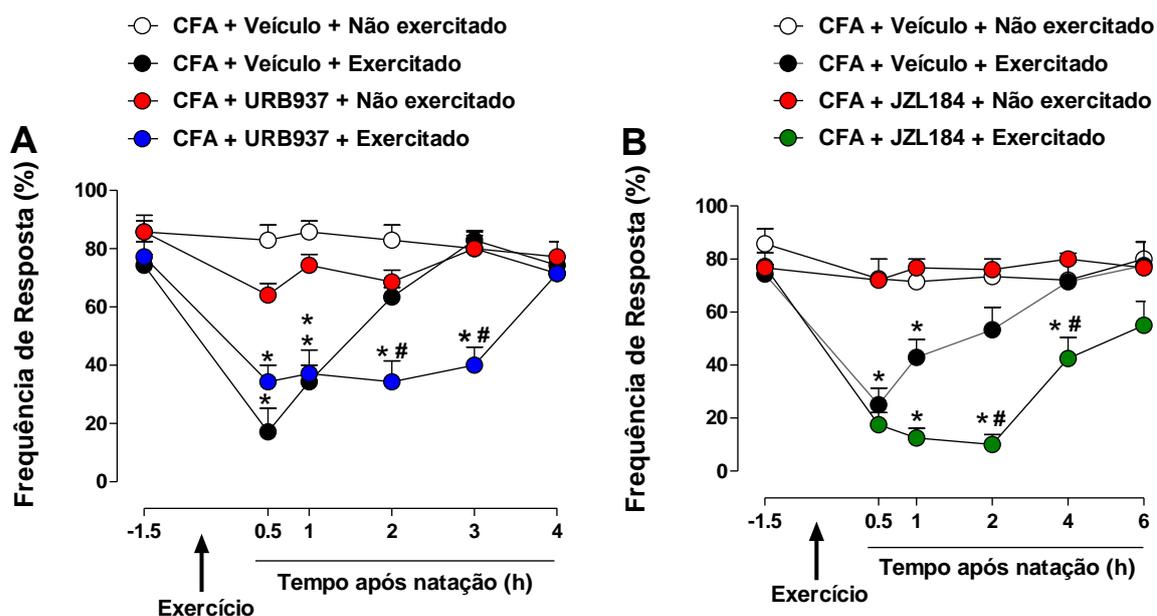


Figura 14 – Participação das enzimas de degradação dos ECBs no efeito hiponociceptivo induzido pela natação de alta intensidade, no modelo de inflamação crônica periférica induzida pelo CFA em camundongos. A: Inibição da enzima que degrada AEA com o pré-tratamento de URB937 (0,1 mg/kg, i.p.); B: Inibição da enzima que degrada 2-AG com o pré-tratamento de JZL184 (1,6mg/kg, i.p.). Cada ponto representa a média de 8 animais, e as barras verticais indicam o Erro-Padrão da Média (E.P.M.). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado ao grupo CFA + Não exercitado ($*P < 0,001$) e o sustenido representa o nível de significância, quando comparado ao grupo CFA + Exercitado ($\#P < 0,01$). ANOVA de duas vias seguida pelo teste Bonferroni. Fonte: elaborada pela autora (2017).

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam e estendem os dados da literatura por demonstrar, pela primeira vez, que a natação de alta intensidade produz hiponocicepção em condição inflamatória crônica, por meio da ativação do sistema ECB, sugerindo um novo mecanismo neuro-humoral da AIEF.

Atualmente, os mecanismos responsáveis pela AIEF são pouco compreendidos. Os resultados de pesquisas pré-clínicas indicam que na AIEF há múltiplos mecanismos de analgesia, incluindo sistemas opioides e não opioides, que contribuem para mudanças na sensação dolorosa resultantes do exercício^{113,126-128}. A hipótese mais comumente testada é a de que o EF induz a liberação de opioides endógenos em sítios periféricos, espinais e/ou supraespinais que contribuem para a modulação da dor^{129,130}.

No entanto, estudos têm sido conduzidos nos quais um antagonista opioide (naltrexona ou naloxona) foi administrado antes do exercício em humanos e animais. Nos estudos em humanos, os resultados foram contraditórios, enquanto que, nos estudos em animais, os antagonistas opioides atenuaram a resposta hipoalgésica após exercício leve (por exemplo, nadando em água morna), mas não apresentaram um efeito consistente na hipoalgesia após um exercício mais intenso (nadando em água fria)^{72,131}. Esses resultados indicam que a AIEF é mediada, em parte, pelo sistema opioide endógeno e que também pode ocorrer hipoalgesia, que é insensível aos antagonistas opioides, o que mostra a evidência de uma hipoalgesia não opioide⁷².

A especulação do possível envolvimento do sistema ECB nas respostas neurobiológicas ao EF surgiu de observações que, a exemplo dos opioides, incluíam tanto o efeito central (melhora afetiva, sensação de bem-estar, redução da ansiedade e calma após o EF) quanto o periférico (redução da dor)^{108,109}.

Além disso, estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que a sinalização ECB desempenha um papel importante na geração dessas respostas induzidas pelo EF em diferentes tecidos e sistemas do organismo (musculoesquelético, cardiorrespiratório e etc.)^{25,110,132,133}.

A partir dessas informações, estudos foram conduzidos a fim de confirmar o envolvimento do sistema ECB na AIEF. Nesse sentido, Galdino e colaboradores

(2014b) submeteram ratos *Wistar* machos, após 3 dias de habituação na esteira, a uma sessão aguda de corrida até a exaustão. Nesse protocolo agudo, os pesquisadores verificaram o efeito antinociceptivo da corrida frente aos estímulos mecânico (teste de Randall e Selitto) e térmico ao calor (teste de retirada da cauda), e que a inibição das enzimas de degradação dos ECBs prolongou esse efeito¹³.

Os autores ainda demonstraram que a ativação dos receptores CB₁ e CB₂ sistêmicos e centrais medeia o efeito antinociceptivo da corrida aguda. Também demonstraram que a sessão aguda de EF aeróbio aumenta a expressão de receptores CB₁ em neurônios da PAG. E, por fim, mostraram que esse protocolo agudo aumenta as concentrações plasmáticas de AEA e 2-AG, bem como os mediadores relacionados à AEA, como PEA e OEA¹³. Posteriormente, Galdino e colaboradores (2014a), utilizando o mesmo desenho experimental do estudo anterior, mas analisando o efeito do exercício de resistência – por meio de um modelo animal de exercício de levantamento de peso em que os ratos vestiam uma jaqueta de lona e recebiam uma estimulação elétrica para que flexionassem as pernas repetidamente – observaram as mesmas respostas descritas no estudo anterior¹².

Normalmente, os estudos que têm investigado a AIEF, a exemplo dos estudos de Galdino e colaboradores^{12,13}, aplicam um estímulo nocivo antes e depois do EF para verificar se após o exercício ocorre analgesia. Vários estímulos nocivos diferentes são utilizados nos laboratórios a fim de produzir dor (nocicepção), incluindo a estimulação elétrica, isquemia, altas ou baixas temperaturas e a pressão (mecânico)^{3,52,134}. Além disso, geralmente, são utilizados animais ou seres humanos saudáveis e ativos^{24,25}. Assim, estuda-se o efeito do EF na dor fisiológica, fenômeno que é fundamental para a sobrevivência dos seres vivos, uma vez que é esse mecanismo que alerta ao corpo sobre os possíveis estímulos nocivos ou potencialmente nocivos, no entanto, pouco útil no cenário clínico.

Nesse sentido, pesquisas envolvendo animais ou indivíduos que sofrem de condições dolorosas crônicas são necessárias para aumentar o conhecimento científico atual acerca dos benefícios do EF, por isto, foi essa a razão que motivou a realização da presente pesquisa. Diferentemente dos trabalhos prévios, o presente estudo demonstrou que sessões repetidas e diárias de natação (durante uma semana) produziram hiponocicepção mecânica e efeito antiedematogênico em camundongos com inflamação crônica na pata. Além disso, as sessões repetidas de natação não apresentaram efeito somatório ou aditivo, pois a hiponocicepção com duração de 1h

foi observada tanto na primeira (primeiro dia) quanto na última sessão (sétimo dia).

Nesse sentido, uma série de observações anedóticas sugerem que a percepção da dor é alterada durante a exposição a vários estressores, fenômeno conhecido como AIEF. Tal analgesia parece ser provocada por uma ampla gama de estressores. Por conta disto, pesquisas têm sido conduzidas com seres humanos e animais, e alguns estressores estudados incluem: desafios térmicos, restrição, rotação, choque elétrico e EF^{12,106,135}. Uma das condições mais comuns de desafiar os sistemas fisiológicos dos seres humanos é o EF¹³⁵, por isso, embora tenham sido publicados numerosos estudos sobre o papel do EF e os seus efeitos nos vários sistemas de resposta ao estresse – por exemplo: a ativação do sistema catecolaminérgico¹³⁶ ou o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal¹³⁷ –, apenas poucos estudos investigaram o papel do sistema ECB em condições de estresse pelo EF¹⁰⁵.

Assim, na presente pesquisa, tomaram-se alguns cuidados para minimizar outros possíveis estresses que poderiam tornar-se empecilhos no trabalho. Para reduzir o estresse da água aquecida, os animais foram submetidos a um protocolo de habituação com duração de quatro dias, antes da natação por 30min, a fim de reduzir o estresse ao ambiente aquático. Isso reduziu o estresse dos animais, evidenciado pela redução do número de bolos fecais observados na água da primeira até a última sessão de habituação. Além disso, ao contrário do estudo de Galdino e colaboradores¹³, que utilizaram uma única sessão, no presente estudo os animais nadaram diariamente (repetidamente) por sete dias, fato que também reduziu o estresse ao ambiente aquático, uma vez que o animal passou a se acostumar com o ambiente. Por fim, para não causar confusão entre o efeito do EF com o estresse do ambiente aquático, as avaliações da nocicepção também foram realizadas diariamente, pois se a hiponocicepção fosse em função do estresse da água o efeito iria se perder ao longo dos dias, fato que não ocorreu.

Além disso, embora o EF seja um agente estressor, foi relatado que não é qualquer intensidade de EF que ativa o sistema ECB¹⁰⁶. Isto porque tem sido demonstrado em seres humanos que apenas o EF de intensidades moderada¹⁰⁶ e alta²⁴, mas não baixa, produzem aumento nas concentrações sanguíneas de AEA. Por esse motivo, nesta pesquisa se optou por utilizar um protocolo de natação de alta intensidade. Dessa forma, o protocolo utilizado no presente estudo foi adaptado do originalmente descrito por Mazzardo-Martins e colaboradores (2010)¹⁸ e no qual já foi demonstrada a redução da hiperalgesia mecânica induzida pela isquemia e

reperfusão do tornozelo – um modelo animal da síndrome da dor regional complexa tipo 1 em camundongos¹³⁸ e que também reduziu a nocicepção somática induzida pela injeção i.pl. de glutamato¹⁴.

Aqui, pela primeira vez, também se demonstrou que a hiponocicepção mecânica inflamatória induzida pela natação de alta intensidade foi prevenida pelo bloqueio dos receptores CB₁ periféricos e espinais. Os receptores CB₁ estão amplamente distribuídos, estando presentes nos terminais periféricos e centrais dos neurônios aferentes nociceptivos, sugerindo a presença deles no SNP, região em que está susceptível a ser ativado por CBs periféricos; nos neurônios do CPME (de segunda ordem), no gânglio sensorial do nervo espinal, no tronco encefálico e nas regiões encefálicas envolvidas nas respostas sensoriais e emocionais à dor^{9,139} e, principalmente, nas vias descendentes de controle da dor^{140,141}. Ainda, na medula espinal, os receptores CB₁ têm sido encontrados em interneurônios e astrócitos¹⁴².

Confirmando o papel da analgesia induzida pela ativação dos receptores CBs, a administração do WIN 55,212-2 – um agonista não seletivo para receptores CB₁ e CB₂ –, produz antinocicepção em vários modelos de dor após administração sistêmica, periférica, espinal e supraespinal^{9,139}. Por essa via, Martins e colaboradores (2013) mostraram que a administração sistêmica, espinal ou i.pl. de AM281 preveniu o efeito hiponociceptivo do WIN 55,212-2, quando administrado sistemicamente⁷. Exceto pelo fato de que o tipo de EF difere entre o presente estudo e os estudos de Galdino e colaboradores (2014a; 2014b)^{12,13}, esses resultados corroboram os achados prévios de Galdino por demonstrar que os receptores CB₁ estão envolvidos na AIEF.

Ainda nesse contexto, Fuss e colaboradores (2015) também encontraram o envolvimento dos receptores CB₁ na AIEF, mas no modelo de EF com a roda de corrida voluntária²³. Contrariamente aos resultados encontrados aqui e ao estudo de Galdino e colaboradores (2014b), no estudo de Martins e colaboradores (2016)¹⁴, o AM281 não preveniu a hiponocicepção induzida pela natação de alta intensidade, demonstrando que não houve a participação dos receptores CB₁ periféricos na hiponocicepção induzida pela natação. Os fatores que podem explicar tal achado podem estar relacionados aos protocolos de natação e de nocicepção utilizados, em que, no estudo de Martins e colaboradores (2016)¹⁴, foram utilizadas duas semanas de natação e que a injeção do agente flogístico (glutamato) foi administrada após a natação, o que diferiu do presente estudo. Assim, com duas semanas de natação

talvez se tenha ECB somente no SNC e, além disso, a resposta dos receptores CB₁ ao EF pode ser diferente em animais saudáveis ou com dor. Dessa maneira, os achados do presente estudo demonstram claramente que existe a participação dos receptores CB₁ tanto periféricos quanto espinais na hiponocicepção induzida pela natação em animais com inflamação crônica periférica.

Semelhantemente aos receptores CB₁, os CB₂ também podem estar envolvidos na hiponocicepção induzida pelo EF. Outro resultado interessante do presente estudo diz respeito ao fato de que a hiponocicepção mecânica induzida pela natação de alta intensidade foi prevenida pelo bloqueio dos receptores CB₂ sistêmicos, periféricos e espinais. Os receptores CB₂ foram inicialmente localizados e são mais altamente expressados em células do sistema imunológico, tais como mastócitos, macrófagos, células *natural killer*, monócitos e polimorfonucleares^{97,143}.

Embora com algumas controvérsias, estudos farmacológicos têm sugerido e estudos moleculares e imunocitoquímicos têm confirmado, posteriormente, a localização dos receptores CB₂ em ambos os neurônios do SNP e SNC^{100,101,144-146}. Vale ressaltar que, em contraste com a localização dos receptores CB₁ predominantemente no terminal axonal pré-sináptico, os receptores CB₂ parecem estar localizados nos corpos celulares e dendritos dos neurônios nociceptivos centrais¹⁰¹ e periféricos¹⁴⁴. Ademais, a ativação de receptores CB₂ pode suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibindo assim a atividade neuronal, normalizando o limiar nociceptivo e produzindo antinocicepção em estados de dor inflamatória.

Nesse sentido, foi demonstrado que o AM1241 (agonista do receptor CB₂) induziu a supressão mediada por receptor CB₂ das respostas evocadas em fibras do tipo C em neurônios de amplo espectro dinâmico na medula espinal; essa supressão foi observada tanto na ausência como na presença de inflamação induzida pela carragenina¹⁴⁷. A administração i.pl. de AEA também suprimiu as respostas evocadas mecanicamente nos neurônios do CPME, no modelo de infamação induzida pela carragenina; esse efeito foi prevenido por um antagonista seletivo (SR144528) para receptores CB₂¹⁴⁸. Esses dados demonstram que a ativação de receptores CB₂ periféricos podem suprimir a atividade neuronal a nível espinal, no entanto, estudos demonstram que a analgesia produzida pela ativação dos receptores CB₂ não é apenas periférica e não envolve apenas as células neuronais.

Nesse contexto, Romero e colaboradores (2007)¹⁴⁹ evidenciaram uma redução

da hiperalgesia mecânica induzida pela redução da ativação de células microgлияis localizadas na medula espinal de ratos que foi mediada pela ativação de receptores CB₂. Igualmente ao modelo de inflamação analisado no presente estudo, Martins e colaboradores (2015)¹²² demonstraram que a administração local (i.pl.) de WIN 55,212-2 promoveu hiponocicepção no modelo de dor inflamatória crônica induzida pelo CFA, sendo que esse efeito foi prevenido pela administração local de AM630. Assim, os autores demonstraram o papel da ativação de receptores CB₂ periféricos na promoção da analgesia na dor inflamatória induzida pelo CFA. Ainda, a exemplo dos trabalhos de Galdino e colaboradores (2014a; 2014b)^{12,13}, que analisaram a AIEF na dor fisiológica, aqui se demonstrou que, para a AIEF em condição inflamatória crônica periférica, a ativação dos receptores CB₂ também se faz necessária.

Pelo fato de que o EF eleva dramaticamente as concentrações de AEA e 2-AG na circulação sistêmica, buscou-se compreender qual mecanismo estaria por trás dessa resposta fisiológica induzida pelo EF, pois a elevação nas concentrações de AEA e 2-AG na circulação sistêmica tem sido demonstrada tanto em estudos pré-clínicos quanto clínicos. Sparling (2003) forneceu a primeira evidência sobre o aumento nas concentrações sanguíneas de AEA e 2-AG após 45min de ciclismo ou corrida¹⁰⁵. Posteriormente, Feuerecker e colaboradores (2012) confirmaram e estenderam essa informação por meio da quantificação sanguínea de AEA e 2-AG em voluntários que foram fisicamente desafiados por um longo período (até 5h) de EF. A principal descoberta foi a de que o exercício por várias horas levou ao aumento da AEA no sangue¹⁰⁶.

Curiosamente, o efeito do EF sobre as concentrações de AEA no sangue aumentou quando o exercício foi combinado com condições hipóxicas hipobáricas moderadas em altitude elevada. Esse efeito aditivo da altitude não se deve ao efeito permanente da hipoxia hipobárica, uma vez que apenas a altitude elevada não teve efeito sobre a concentração sanguínea de ECBs¹⁰⁶. Assim, em estudos pré-clínicos tem sido observado o aumento de AEA e 2-AG em protocolos agudos de EF forçado, como esteira e de resistência, bem como voluntário, na roda de corrida voluntária em camundongos^{12,13,23}. Paralelamente a essas informações, recentemente, a inibição das enzimas de degradação dos ECBs tem sido uma nova abordagem que está despertando grande interesse por parte dos pesquisadores no tratamento da dor, pois induz o aumento das concentrações sanguíneas dos ECBs. Nesse sentido, conjecturou-se que a natação pudesse, por intermédio de um mecanismo fisiológico,

aumentar as concentrações sanguíneas dos ECBs e, assim, intensificar ou prolongar a AIEF por meio da inibição dessas enzimas.

No presente estudo se observou que tanto a inibição da degradação da AEA quanto do 2-AG prolongou a hiponocicepção produzida pela natação. Assim, especula-se que a natação, por um mecanismo que precisa ainda ser melhor investigado, possa inibir as enzimas de degradação dos ECBs, aumentando as concentrações sanguíneas e, dessa forma, ativando os receptores CB₁ e CB₂, tanto periféricos quanto centrais, produzindo hiponocicepção. No entanto, mais estudos são necessários para fortalecer essa hipótese, bem como a realização de experimentos que dosem as concentrações dos ECBs nos animais submetidos a esse protocolo de natação.

É intrigante especular que o aumento na concentração sistêmica de AEA durante o EF pode ocorrer em paralelo com um engajamento central do sistema ECB, o que pode ajudar a explicar as mudanças psicológicas da AIEF, interagindo diretamente ou por intermédio de outros sistemas de neurotransmissores, como os opioides, as catecolaminas e a serotonina. Independentemente da especulação de que os ECBs possam contribuir para o fenômeno popularmente conhecido como “*runner’s high*” – sensação de euforia experimentada por alguns atletas em corrida extenuante –, os resultados do presente estudo sugerem um mecanismo plausível para a AIEF e abrem novas perspectivas na fisiologia do exercício e para o tratamento da dor.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, os achados sugerem que a natação de alta intensidade:

- 1) Induz efeito hiponociceptivo e antiedematogênico;
- 2) Ativa os receptores CB₁ e CB₂ tanto a nível periférico quanto a nível central;
- 3) Tem seu efeito hiponociceptivo prolongado após a inibição das enzimas de degradação dos principais ECBs.

Dessa forma, conclui-se que o EF de natação é efetivo na redução da nocicepção, sendo esse efeito mediado, pelo menos em parte, pela ativação de receptores CBs centrais e periféricos. Além disso, a inibição das enzimas de degradação dos ECBs parece ser um fenômeno importante para a ação da natação. Assim, esses resultados confirmam e estendem a literatura, fortalecendo o conhecimento a respeito desse sistema, ao demonstrar a participação desses receptores também em condição patológica.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

No cenário da dor, o EF já faz parte dos programas de tratamento, sendo assim, os dados do presente estudo confirmam as pesquisas clínicas e demonstram, em nível mais detalhado, o envolvimento do sistema ECB que pode nortear a intensidade do EF no tratamento da dor e ser uma abordagem integrativa interessante, sem os efeitos colaterais produzidos pelos agonistas CB₁. Além disso, o EF praticado na intensidade correta também poderá ser usado como uma abordagem adjuvante em sinergismo ao uso de medicamentos com mecanismo CB, a fim de diminuir a ingestão, reduzindo os efeitos colaterais.

Para estudos futuros, sugerem-se análises bioquímicas e histológicas, a fim de dosar, nos animais submetidos a esse protocolo de natação, as concentrações sanguíneas dos ECBs, assim como verificar a possível participação desse sistema no mecanismo de resolução da inflamação.

REFERÊNCIAS

1. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain*. 2008;137(3):473-7.
2. Fox CD, Berger D, Fine PG. A position statement from the American Pain Society. Glenview: American Pain Society; 2000.
3. Neto AO, Costa CMC, Siqueira JTT e colaboradores. Dor: Princípios e Práticas. In: Costa CMC, Santos TJT e Costa SBC. Modelos animais e laboratoriais de dor. Porto Alegre: Artmed; 2009. p. 305-12.
4. Piomelli D. The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6(7):672-9.
5. Da Silva KA, Paszcuk AF, Passos GF, Silva ES, Bento AF, Meotti FC, et al. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain*. 2011;152(8):1872-87.
6. Stein C, Machelska H. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. *Pharmacol Rev*. 2011;63(4):860-81.
7. Martins DF, Mazzardo-Martins L, Cidral-Filho FJ, Gadotti VM, Santos AR. Peripheral and spinal activation of cannabinoid receptors by joint mobilization alleviates postoperative pain in mice. *Neuroscience*. 2013;255:110-21.
8. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):161-202.
9. Walker JM, Hohmann AG. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):509-54.

10. Ahn K, Johnson DS, Mileni M, Beidler D, Long JZ, McKinney MK, et al. Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain. *Chem Biol.* 2009;16(4):411-20.
11. Zogopoulos P, Vasileiou I, Patsouris E, Theocharis SE. The role of endocannabinoids in pain modulation. *Fundam Clin Pharmacol.* 2013;27(1):64-80.
12. Galdino G, Romero T, Silva JFP, Aguiar D, de Paula AM, Cruz J, et al. Acute resistance exercise induces antinociception by activation of the endocannabinoid system in rats. *Anesth Analg.* 2014a;119(3):702-15.
13. Galdino G, Romero T, Silva JFP, Aguiar DC, de Paula AM, Cruz JS, et al. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology.* 2014b;77:313-24.
14. Martins DF, Siteneski A, Ludtke DD, Dal-Secco D, Santos AR. High-intensity swimming exercise decreases glutamate-induced nociception by activation of G-protein-coupled receptors inhibiting phosphorylated protein kinase A. *Mol Neurobiol.* 2016. Epub 2016 Sep 13.
15. Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 2007;30(9):467-72.
16. Booth FW. Waging war on physical inactivity: Using modern molecular ammunition against an ancient enemy. *J Appl Physiol.* 2002;93(1):3-30.
17. Kuphal KE, Fibuch EE, Taylor BK. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. *J Pain.* 2007;8(12):989-97.
18. 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):384-93.
19. Lana AC, Paulino CA, Goncalves ID. Influência dos exercícios físicos de baixa e alta intensidade sobre o limiar de hipernocicepção e outros parâmetros em ratos. *Rev Bras Med Esporte*. 2006;12(5):248-54.
 20. Souza JB. Poderia a atividade física induzir analgesia em pacientes com dor crônica?. *Rev Bras Med Esporte*. 2009;15(2):145-50.
 21. Di Marzo V. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1392(2-3):153-75.
 22. 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.
 23. Fuss J, Steinle J, Bindila L, Auer MK, Kirchherr H, Lutz B, et al. A runner's high depends on cannabinoid receptors in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(42):13105-8.
 24. Heyman E, Gamelin FX, Goekint M, Piscitelli F, Roelands B, Leclair B, et al. Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans—Possible implications for reward and depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37:844-51.
 25. Raichlen DA, Foster AD, Gerdeman GL, Seillier A, Giuffrida A. Wired to run: exercise-induced endocannabinoid signaling in humans and cursorial mammals and the evolution of the runner's high. *J Exp Biol*. 2012;215(8):1331-6.
 26. Alvarez-Jaimes LJ, Palmer JA. The role of endocannabinoids in pain modulation and the therapeutic potential of inhibiting their enzymatic degradation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(10):1644-59.

27. Smith FL, Fujimori K, Lowe J, Welch SP. Characterization of delta9-tetrahydrocannabinol and anandamide antinociception in nonarthritic and arthritic rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;60(1):183-91.
28. Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B. The inhibition of monoacylglycerol lipase by URB602 showed an anti-inflammatory and antinociceptive effect in a murine model of acute inflammation. *Br J Pharmacol.* 2007;152(5):787-94.
29. Peter Libby. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65(2):140-6.
30. Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett.* 2011;585(23):3798-805.
31. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010;140(6):771-6.
32. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004;18(3):385-405.
33. McConnell TH. The nature of disease pathology for the health professions. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
34. Francischetti I, Moreno JB, Scholz M, Yoshida WB. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2010;25(4):575-84.
35. Schneider A, Barros CC. Resposta inflamatória – parte 1 [internet]. Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Pelotas. Acesso 20 de maio de 2016. Disponível em: <http://wp.ufpel.edu.br/patogeralnutricao/files/2013/05/Resposta-Inflamat%C3%B3ria-Parte-1.pdf>.

36. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013;63(1):149-64.
37. Neto AO, Costa CMC, Siqueira JTT e colaboradores. Dor: Princípios e Práticas. In: Ferreira SH, Ferrari LF, Cunha TM, Nascimento PGBD, Junior WAV e Cunha FQ. Dor inflamatória. Porto Alegre: Artmed; 2009. p. 265-79.
38. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10.
39. Basbaum AI, Bushnell MC. *Science of Pain*. 1. ed. Califórnia: Academic Press; 2009.
40. Kreling MCGD, Cruz DALM, Pimenta CAM. Prevalência de dor crônica em adultos. *Rev Bras Enferm*. 2006;4(59):509-13.
41. Neto AO, Costa CMC, Siqueira JTT e colaboradores. Dor: Princípios e Práticas. In: Neto GFD. Dor aguda versus dor crônica. Porto Alegre: Artmed; 2009. p. 319-34.
42. Wall PD, Melzack R. *Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999.
43. Kandel ER. *Princípios da neurociências*. 5. ed. Porto Alegre: AMGH; 2014.
44. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ*. 2003;81(9):646-56.
45. Chung JI, Barua S, Choi BH, Min BH, Han HC, Baik EJ. Anti-inflammatory effect of low intensity ultrasound (LIUS) on complete Freund's adjuvant-induced arthritis synovium. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012;20(4):314-22.
46. Chaganti RK, Lane NE. Risk factors for incident osteoarthritis of the hip and knee. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2011;4(3):99-104.

47. Sharma L, Berenbaum F. Osteoarthritis: a companion to Rheumatology. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007.
48. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state of the art, prospects, and future challenges. *Bone*. 2016;85:81-90.
49. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:1323-30.
50. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(5):471-8.
51. Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(7):521-32.
52. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211:39-50.
53. Negus SS, Vanderah TW, Brandt MR, Bilsky EJ, Becerra L, Borsook D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(2):507-14.
54. Larson AA, Brown DR, el-Atrash S, Walser MM. Pain threshold changes in adjuvant-induced inflammation: a possible model of chronic pain in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986;24(1):49-53.
55. Chillingworth NL, Donaldson LF. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. *J Neurosci Methods*. 2003;128(1-2):45-52.
56. Neugebauer V, Han JS, Adwanikar H, Fu Y, Ji G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain*. 2007;3:8.

57. Verri WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther.* 2006;112(1):116-38.
58. Dinarello CA Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503-8.
59. Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011;48(1):100-5.
60. Ferrari LF, Bogen O, Reichling DB, Levine JD. Accounting for the delay in the transition from acute to chronic pain: axonal and nuclear mechanisms. *J Neurosci.* 2015;35(2):495-507.
61. Brum PC, Forjaz CLM, Tinucci T, Negrão CE. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Rev Paul Educ Fís.* 2004;18(1):21-31.
62. Maughan R, Gleeson M, Greenhaff PI. *Bioquímica do exercício e do treinamento.* São Paulo: Manole; 2000.
63. Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, et al. Neurobiology of exercise. *Obesity.* 2006;14(3):345-56.
64. Booth ML, Bauman A, Owen N, Gore CJ. Physical activity preferences, preferred sources of assistance, and perceived barriers to increased activity among physically inactive Australians. *Prev Med.* 1997;26(1):131-7.
65. US Census Bureau. The 2009 statistical abstract of the United States: Commerce Department, Census Bureau (publ.). Washington, DC; 2009.
66. Esteves LMZS, Simões HG, Oliveira SML, Cunha VNC, Coelho JMO, Neto WB, et al. Respostas cardiovasculares pós-exercício de natação. *Rev Bras Med Esporte.* 2010;16(6):418-21.

67. Becker BE, Cole AJ. Aquatic rehabilitation. In: Lisa JA, Gans BM, editors. Rehabilitation medicine: principles and practice. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 887-901.
68. Tanaka H. Swimming exercise. Sports Med. 2009;39(5):377-87.
69. Foss ML, Keteyian SJ. Bases Fisiológicas do Exercício e do Esporte. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
70. Wright A, Sluka KA. Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain. Clin J Pain. 2001;17(1):33-46.
71. Gowans SE, de Hueck A. Effectiveness of exercise in management of fibromyalgia. Curr Opin Rheumatol. 2004;16(2):138-42.
72. Koltyn KF. Analgesia following exercise: a review. Sports Med. 2000;29(2):85-98.
73. Bobinski F. Exercício físico de baixa intensidade na terapêutica da dor neuropática e regeneração nervosa periférica: efeitos neurobiológicos e estudo dos mecanismos de ação [tese]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.
74. Cannon WB. Organization for physiological homeostasis. Physiol Rev. 1929;9(1):399-431.
75. Benarroch EE. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. Neurology. 2008;71(3):217-21.
76. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. Anesthesiology. 2011;115(6):1363-81.
77. Oprée A, Kress M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat

- hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci*. 2000;20(16):6289-93.
78. Seifert F, Kiefer G, DeCol R, Schmelz M, Maihöfner C. Differential endogenous pain modulation in complex-regional pain syndrome. *Brain*. 2009;132(3):788-800.
79. Talwar R, Potluri VK. Cannabinoid 1 (CB1) receptor-pharmacology, role in pain and recent developments in emerging CB1 agonists. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011;10(5):536-44.
80. Fox A, Bevan S. Therapeutic potential of cannabinoid receptor agonists as analgesic agents. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005;14(6):695-703.
81. Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):389-462.
82. Di marzo V, Petrocellis L. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med*. 2006;57:553-74.
83. Di marzo V, Deutsch DG. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis*. 1998;5(6):386-404.
84. Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci*. 1996;16(12):3934-42.
85. Burston JJ, Woodhams SG. Endocannabinoid system and pain: an introduction. *Proc Nutri Soc*. 2014;73(1):106-17.
86. McDougall JJ. Cannabinoids and Pain Control in the Periphery. In: Cairns BE Cood. *Peripheral receptor targets for analgesia novel approaches to pain management*. British Columbia: Wiley; 2009. p. 325-38.

87. Begg M, Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther.* 2005;106(2):133-45.
88. Bosier B, Muccioli GG, Hermans E, Lambert DM. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(1):1-12.
89. Spigelman I. Therapeutic targeting of peripheral cannabinoid receptors in inflammatory and neuropathic pain states. In: Kruger L, Light AR (ed.). *Translational pain research: from mouse to man.* Boca Raton, FL: CRC Press; 2010.
90. Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol.* 2005;168:299-325.
91. Brown SP, Safo PK, Regehr WG. Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J Neurosci.* 2004;24(24):5623-31.
92. Stumpff F, Boxberger M, Krauss A, Rosenthal R, Meissner S, Choritz L, et al. Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork. *Exp Eye Res.* 2005;80(5):697-708.
93. Price TJ, Helesic G, Parghi D, Hargreaves KM, Flores CM. The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. *Neuroscience.* 2003;120(1):155-62.
94. Binzen U, Greffrath W, Hennessy S, Bausen M, Saaler-Reinhardt S, Treede RD. Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience.* 2006;142(2):527-39.

95. Hohmann AG, Herkenham M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*. 1999;92(4):1171-5.
96. Mcallister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME. Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in an *Xenopus* oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291(2):618-26.
97. Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995;232(1):54-61.
98. Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, et al. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse*. 2004;53(4):208-13.
99. Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett*. 2006;396(2):113-6.
100. Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 2005;310(5746):329-32.
101. Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 2006;1071(1):10-23.
102. Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, et al. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(8):3093-8.
103. Beltramo M, Bernardini N, Bertorelli R, Campanella M, Nicolussi E, Fredduzzi S, et al. CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci*. 2006;23(6):1530-8.

104. Tantimonaco M, Ceci R, Sabatini S, Catani MV, Rossi A, Gasperi V, et al. Physical activity and the endocannabinoid system: an overview. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(14):2681-98.
105. Sparling PB, Giuffrida A, Piomelli D, Rosskopf L, Dietrich A. Exercise activates the endocannabinoid system. *Neuroreport.* 2003;14(17):2209-11.
106. Feurecker M, Hauer D, Toth R, Demetz F, Hölzl J, Thiel M, et al. Effects of exercise stress on the endocannabinoid system in humans under field conditions. *Eur J Appl Physiol.* 2012;112(7):2777-81.
107. Sachs M, Pargman D. Running addiction: a depth view. *J Sports Behav.* 1979;2:143-55.
108. Ogles BM, Masters KS. A typology of marathon runners based on cluster analysis of motivations. *J Sports Behav.* 2003;26:69-85.
109. Dietrich A, McDaniel WF. Endocannabinoids and exercise. *Br J Sports Med.* 2004;38(5):536-41.
110. Rasmussen EB, Hillman C. Naloxene and rimonabant reduce the reinforcing properties of exercise in rats. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2011;19(6):389-400.
111. Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, et al. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci.* 2007;10(7):870-9.
112. Gerdeman GL. Endocannabinoids at the synapse – retrograde signaling and presynaptic plasticity in the brain. In: Kofalvi A, editor. *Cannabinoids and the Brain.* Springer-Verlag: New York; 2008. p. 203-36.
113. Hohmann AG, Suplita RL. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* 2006;8(4):693-708.

114. Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, et al. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition not present in CNS. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2003;100(18):10529-33.
115. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(11):873-84.
116. Richardson JD. Cannabinoids modulate pain by multiple mechanisms of action. *J Pain*. 2000;1:2-14.
117. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, Barnich N, Neut C, Dubuquoy L, et al. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med*. 2007;13:35-7.
118. Robinson L, Goonawardena AV, Pertwee R, Hampson RE, Platt B, Riedel G. WIN 55,212-2 induced deficits in spatial learning are mediated by cholinergic hypofunction. *Behav Brain Res*. 2010;208:584-92.
119. Khasabova IA, Chandiramani A, Harding-Rose C, Simone DA, Seybold VS. Increasing 2-arachidonoyl glycerol signaling in the periphery attenuates mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. *Pharmacol Res*. 2011;64:60-7.
120. Gu X, Mei F, Liu Y, Zhang R, Zhang J, Ma Z. Intrathecal administration of the cannabinoid 2 receptor agonist JWH015 can attenuate cancer pain and decrease mRNA expression of the 2B subunit of N-methyl-D-aspartic acid. *Anesth Analg*. 2011;113:405-11.
121. Daniel WW. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. New York: John Wiley & Sons; 2008.
122. Martins DF, Brito RN, Stramosk J, Batisti AP, Madeira F, Turnes BL, et al. Peripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water

- immersion therapy on persistent inflammatory pain. *J Neurosci Res*. 2015;93(1):157-66.
123. Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Guijarro A, Vacondio F, Duranti A, et al. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci*. 2010;13:1265-70.
124. Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, et al. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol*. 2009;5:37-44.
125. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16:109-10.
126. Grisel J, Fleshner M, Watkins L, Maier S. Opioid and non-opioid interactions in two forms of stress-induced analgesia. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;45(1):161-72.
127. Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. *Science*. 1980;208(4444):623-5.
128. Mogil JS, Sternberg WF, Balian H, Liebeskind JC, Sadowski B. Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: A parametric analysis in mice. *Physiol Behav*. 1996;59(1):123-32.
129. Hoffmann P, Terenius L, Thorén P. Cerebrospinal fluid immunoreactive beta-endorphin concentration is increased by voluntary exercise in the spontaneously hypertensive rat. *Regul Pept*. 1990;28(2):233-9.
130. Thorén P, Floras JS, Hoffmann P, Seals DR. Endorphins and exercise: Physiological mechanisms and clinical implications. *Med Sci Sports Exerc*. 1990;22(4):417-28.
131. Cook DB, Koltyn KF. Pain and exercise. *Int J Sport Psychol*. 2000;31:256-77.

132. Dubreucq S, Koehl M, Abrous DN, Marsicano G, Chaouloff F. CB1 receptor deficiency decreases wheel-running activity: consequences on emotional behaviours and hippocampal neurogenesis. *Exp Neurol*. 2010;224(1):106-13.
133. Hill MN, Titterness AK, Morrish AC, Carrier EJ, Lee TTY, Gil-Mohapel J, et al. Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus*. 2010;20(4):513-23.
134. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 2001;53(4):597-652.
135. Nielsen HG, Øktedalen O, Opstad PK, Lyberg T. Plasma cytokine profiles in long-term strenuous exercise. *J Sports Med (Hindawi Publ Corp)*. 2016;2016:7186137.
136. Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Med*. 2008;38(5):401-23.
137. Flinn MV, Nepomnaschy PA, Muehlenbein MP, Ponzi D. Evolutionary functions of early social modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis development in humans. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(7):1611-29.
138. 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.
139. Finn DP, Chapman V. Cannabinoids as analgesic agents: evidence from in vivo studies. *Curr Neuropharmacol*. 2004;2(1):75-89.
140. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*. 1997;74(2):129-80.

141. Svizenska I, Dubovy P, Sulcova A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures – a short review. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;90(4):501-11.
142. Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci.* 2000;15(6):510-21.
143. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(9):771-84.
144. Duncan M, Mouihate A, Mackie K, Keenan CM, Buckley NE, Davison JS, et al. Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(1):78-87.
145. Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1074:514-36.
146. Ständer S, Schmelz M, Metze D, Luger T, Rukwied R. Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci.* 2005;38(3):177-88.
147. Nackley AG, Zvonok AM, Makriyannis A, Hohmann AG. Activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses C-fiber responses and windup in spinal wide dynamic range neurons in the absence and presence of inflammation. *J Neurophysiol.* 2004;92(6):3562-74.
148. Sokal DM, Elmes SJR, Kendall DA, Chapman V. Intraplantar injection of anandamide inhibits mechanically-evoked responses of spinal neurones via activation of CB2 receptors in anaesthetised rats. *Neuropharmacology* 2003;45(3):404-11.

149. Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology*. 2007;106(4):787-94.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Produção científica publicada durante o período do Mestrado

Mal Numbiol
 DOI 10.1007/s12035-016-0095-9



High-Intensity Swimming Exercise Decreases Glutamate-Induced Nociception by Activation of G-Protein-Coupled Receptors Inhibiting Phosphorylated Protein Kinase A

Daniel F. Martins¹ · Aline Siteneski¹ · Daniela D. Ludtke¹ · Daniela Dal-Secco² · Adair R. S. Santos²

Received: 2 May 2016 / Accepted: 1 September 2016
 © Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Several studies in humans have reported that improved pain control is associated with exercise in a variety of painful conditions, including osteoarthritis, fibromyalgia, and neuropathic pain. Despite the growing amount of experimental data on physical exercise and nociception, the precise mechanisms through which high-intensity exercise reduces pain remain elusive. Since the glutamatergic system plays a major role in pain transmission, we firstly analyzed if physical exercise could be able to decrease glutamate-induced nociception through G-protein-coupled receptor (G-PCR) activation. The second purpose of this study was to examine the effect of exercising upon phosphorylation of protein kinase A (PKA) isoforms induced by intraplantar (i.pl.) glutamate injection in mice. Our results demonstrate that high-intensity swimming exercise decreases nociception induced by glutamate and that i.pl. or intrathecal injections of cannabinoid, opioid, and adenosine receptor antagonists, AM251, naloxone, and 1,3-dipropyl-8-cyclohexylxanthine (DPCPX), respectively, prevent this effect. Furthermore, the peripheral A₁ and opioid receptors, but not CB₁, are also involved in exercise's effect. We also verified that glutamate injection increases levels of phosphorylated PKA (p-PKA). High-intensity swimming exercise significantly prevented p-PKA

increase. The current data show the direct involvement of the glutamatergic system on the hyponociceptive effect of high-intensity swimming exercise as well as demonstrate that physical exercise can activate multiple intracellular pathways through G-PCR activation, which share the same endogenous mechanism, i.e., inhibition of p-PKA.

Keywords Adenosine · Cannabinoid · Glutamate · Nociception · Opioid · Physical activity

Introduction

The excitatory amino acid glutamate (Glu) and glutamatergic receptors are located in the nervous system (peripheral and central) and play a crucial role in the nociceptive signals. The major Glu receptor subtypes at glutamatergic synapses are currently subdivided into ionotropic (including *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors, such as α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) and kainate receptors) and metabotropic Glu receptors [1, 2]. It is now well established that modulation of Glu receptors has potential for therapeutic utility in several categories of persistent pain, including neuropathic pain resulting from injury and/or disease of peripheral nerves, inflammatory, or joint-related pain. Symptoms associated with these classes of persistent pain can include hyperalgesia, allodynia, and spontaneous pain [1].

Glu is released in the primary sensory nerve at central terminals in response to noxious stimuli [3–5] and inflammation [6, 7]. A direct injection of Glu in the mouse footpad area causes an immediate nociceptive response identified by a licking behavior. This model of nociception has been broadly used to understand the mechanisms of nociceptive transmission and the mechanism of action for analgesic approaches

Daniel F. Martins and Aline Siteneski contributed equally to this study.

✉ Daniel F. Martins
 dan.f.martins@unicat.br

¹ Experimental Neuroscience Laboratory, Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern of Santa Catarina, Campus Grande Fátima, Fátima, Santa Catarina, Brazil

² Neurobiology Laboratory of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Center for Biological Sciences, Fafael University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Published online: 13 September 2016

Springer

ANEXO

ANEXO A- Parecer Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



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

Tubarão, 30 de setembro de 2014.
Registro na CEUA (código): 14.005.4.08.IV

Ao pesquisador: Daniel Fernandes Martins
Daniela Dero Ludtke

Curso de Fisioterapia - Campus Universitário Pedra Branca

Prezado(a) Pesquisador(a) ,

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa **“Análise do envolvimento do sistema canabinóide na analgesia induzida pelo exercício físico em um modelo animal de dor inflamatória”** 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.


Peter Johann Bürger
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNISUL
Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina
☎ (48) 3279-1036
✉ ceua@unisul.br peter.burger@unisul.br