



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

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FRANCIELLY SUZAINÉ DA SILVA

**NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE MELHORA OS ASPECTOS SENSORIAIS,
COGNITIVOS E EMOCIONAIS DA DOR NEUROPÁTICA E PROMOVE
IMUNORREGULAÇÃO NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS COM
LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

Palhoça

2022

FRANCIELLY SUZAINÉ DA SILVA

**NATAÇÃO DE ALTA INTENSIDADE MELHORA OS ASPECTOS SENSORIAIS,
COGNITIVOS E EMOCIONAIS DA DOR NEUROPÁTICA E PROMOVE
IMUNORREGULAÇÃO NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS COM
LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

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

Orientadora: Franciane Bobinski, Dra.

Palhoça

2022

S58 Silva, Francielly Suzaine da, 1989 -

Natação de alta intensidade melhora os aspectos sensoriais, cognitivos e emocionais da dor neuropática e promove imunorregulação no córtex pré-frontal de camundongos com lesão nervosa periférica / Francielly Suzaine da Silva. – 2022.

71 f. : il. color. ; 30 cm

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

Orientação: Prof.^a Franciane Bobinski

1. Dor neuropática. 2. Natação. 3. Exercícios físicos. 4. Córtex pré-frontal. 5. Cognição. I. Bobinski, Franciane. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.0472

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Natação de alta intensidade melhora os aspectos sensoriais, cognitivos e emocionais da dor neuropática e promove imunorregulação no córtex pré-frontal de camundongos com lesão nervosa periférica

FRANCIELLY SUZAINÉ DA SILVA

AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 23 de fevereiro de 2022.

Doutora Franciane Bobinski (Orientador)  _____

Doutora Caroline Cunha do Espírito Santo (Avaliador externo – UFSC) – *presente por videoconferência*

Doutor Daniel Fernandes Martins (Avaliador interno) – *presente por videoconferência*



Professor Doutor Jefferson Iraebert

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Sandra e à minha vó Osmarina que moldaram quem eu sou, àquela que valoriza a educação, o amor e a humanidade, vocês foram (e são) estrelas que me guiam.

À minha irmã, Danielly, por ter sido o melhor presente na minha vida, por estar ao meu lado desde seu nascimento. Pelo apoio, conselho, ombro amigo, por ser minha melhor amiga e por ser simplesmente você. Meu pai, Carlos Rogério, que desde sempre mostrou que a educação era a resposta.

À minha família, Queila, por ser minha calma durante as tempestades, meu pé no chão em meio ao furacão, por não deixar eu desanimar e por segurar minha mão sempre, por me trazer a paz que eu preciso, eis meu equilíbrio. Ana, por fazer eu enxergar tudo com tranquilidade, otimismo e por iluminar a vida com sua presença e risadas. Fernanda, por me trazer paz com teu jeito e tua voz, por me mostrar como ser uma pessoa melhor, por me incentivar em toda sua essência. Júlia, por ser meu lado mais intenso, por ser minha amiga desde o primeiro dia de aula da graduação e por nunca ter soltado minha mão. Shirley, por ser minha fé, por acreditar no meu potencial e por me dar esperança num mundo melhor. E à toda minha família (Tia Elizabeth, Elói, Antony e Eduarda) que me apoiou. Eu amo muito vocês.

À minha orientadora, professora Dra. Franciane. Obrigada por ser quem você é, por ser tão especial e por ter me tranquilizado (desde o início), obrigada por todos os milhões de ensinamentos, por toda paciência, paciência e muita paciência. Você foi a professora mais incrível que eu já tive na vida e eu não sei o que teria sido de mim sem você. Obrigada por ser tão empática e pela paciência (já agradeço?). Sorte de todos nós, seus orientandos por tê-la. Foi uma honra.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e aos professores do programa por me proporcionarem essa experiência e por todo acolhimento. Ao Laboratório de Neurociências Experimental da UNISUL (LaNEx), pela disponibilidade da estrutura que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa. Aos colegas de laboratório (não citarei nomes para não esquecer ninguém e não ser injusta), mas lembro de todas as mensagens que mandaram incentivando e apoiando os seminários e experimentos durante esses dois anos (me inspirei em vocês), obrigada.

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

“A dor é temporária. Ela pode durar um minuto, ou uma hora, ou um dia, ou um ano, mas finalmente ela acabará e alguma outra coisa tomará o seu lugar. Se eu paro, no entanto, ela dura para sempre.” Lance Armstrong

RESUMO

Introdução: A dor neuropática é consequência de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial. Além da redução da qualidade de vida e saúde física, a dor neuropática leva a comorbidades emocionais como depressão e ansiedade. A natação já se mostrou capaz de reduzir a dor neuropática, além de restaurar a função motora e nervosa após lesões neuronais, no entanto, os mecanismos neuroimunes supraespinais ainda não estão totalmente estabelecidos.

Objetivo: Compreender o efeito da natação nos componentes sensorial, afetivo e cognitivo da dor neuropática, e compreender o mecanismo de ação dessa terapia sobre as interações neuroimunes no córtex pré-frontal (CPF) após a lesão nervosa periférica.

Métodos: Esse trabalho pré-clínico (CEUA 21.007.4.01.IV) utilizou camundongos Swiss machos divididos em 4 grupos: Sham/Não exercitado (n=9); Sham/Natação (n=10); Lesão/Não exercitado (n=10) e Lesão/Natação (n=9), que passaram por cirurgia de esmagamento do nervo isquiático/ou cirurgia sham e que foram submetidos a um protocolo de natação de 4 semanas, iniciado no 3º dia após a lesão. A intensidade do protocolo de natação foi definido pela concentração de lactato sanguíneo e definição da máxima fase estável do lactato. Para a avaliação do componente sensorial da dor neuropática foi utilizado teste de von Frey. A dor espontânea e o componente emocional foram avaliados pelo teste de campo aberto e o componente cognitivo foi avaliado pelo teste de esquiva ao estímulo mecânico. No 22ª após a lesão, os animais foram eutanasiados e amostras do CPF foram retiradas para análise. O Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA) foi utilizado para mensuração da interleucina (IL)-4, IL-6 e IL-10 e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Por ensaio de *Western Blotting* foi mensurado o imunoconteúdo de Iba-1 (marcador de micróglia) e GFAP (marcador de astrócitos), além de imunomarcadores de fenótipo da micróglia M1 (CD86 e NOS2) e M2 (Arg-1, CD206). **Resultados:** A lesão do nervo isquiático induziu hiperalgesia mecânica e alterou os comportamentos relacionados a cognição e ansiedade. A natação de alta intensidade nos animais que tiveram o nervo lesionado reduziu a hiperalgesia mecânica, a latência de escape do estímulo luminoso aversivo, e promoveu aumento da exploração do

centro do campo aberto. Além de reduzir a concentração de IL-6, IL-4, IL-10 e BDNF no CPF, 22 dias após lesão nervosa.

Conclusão: Os resultados mostraram que a natação produziu analgesia, melhorando os comportamentos envolvidos com os aspectos sensório-discriminativo, afetivo-motivacional e avaliativo-cognitivo da dor neuropática, além de promover efeito imunorregulatório no CPF.

Descritores: Natação. Exercício físico. Dor neuropática. Córtex pré-frontal. Células gliais. Citocinas. Cognição.

ABSTRACT

Introduction: Neuropathic pain is a consequence of an injury or disease that affects the somatosensory system. In addition to reduced quality of life and physical health, neuropathic pain leads to emotional comorbidities such as depression and anxiety. Swimming has already been shown to be able to reduce neuropathic pain, in addition to restoring motor and nerve function after neuronal injuries, however, supraspinal neuroimmune mechanisms are not yet fully established.

Objective: To understand the effect of swimming on the sensory, affective, and cognitive components of neuropathic pain, and to understand the mechanism of action of this therapy on neuroimmune interactions in the prefrontal cortex (PFC) after peripheral nerve injury.

Methods: This preclinical study (CEUA 21.007.4.01.IV) used male Swiss mice divided into 4 groups: Sham/Non exercised (n=9); Sham/Exercised (n=10); PNI/Non exercised (n=10) and PNI/Exercised (n=9), who underwent sciatic nerve crush surgery/or sham surgery and who underwent a 4-week swimming protocol, starting on the 3rd day after the injury. The intensity of the swimming protocol was defined by the blood lactate concentration and definition of the maximal lactate steady state. To assess the sensory component of neuropathic pain, the von Frey test was used. Spontaneous pain and the emotional component were assessed by the open field test and the cognitive component was assessed by the mechanical conflict-avoidance system. On the 22nd day after injury, the animals were euthanized, and PFC samples were taken for analysis. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to measure interleukin (IL)-4, IL-6 and IL-10 and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). By Western Blotting assay, the immunocontent of Iba-1 (microglia marker) and GFAP (astrocyte marker) was measured, as well as immunomarkers of microglial phenotype M1 (CD86 and NOS2) and M2 (Arg-1, CD206).

Results: Sciatic nerve injury induced mechanical hyperalgesia and altered behaviors related to cognition and anxiety. High-intensity swimming in the animals that had the nerve injured reduced mechanical hyperalgesia, the escape latency of the aversive light stimulus, and promoted increased exploration of the center of the open field. In addition to reducing the concentration of IL-6, IL-4, IL-10 and BDNF in PFC, 22 days after nerve injury.

Conclusion: The results showed that swimming produced analgesia, improving the behaviors involved with the sensory-discriminative, affective-motivational, and evaluative-cognitive aspects of neuropathic pain, in addition to promoting an immunoregulatory effect on PFC.

Keywords: Swimming. Exercise. Neuropathic pain. Prefrontal cortex. Glial cells. Cytokines. Cognition.

LISTAS

Lista de abreviaturas

AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

ANOVA – Análise de Variância

Arg-1 – Arginase-1

ATP – Adenosina Trifosfato

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

BSA – Albumina de Soro Bovino

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCL2 – Quimiocina Motivo C-C ligante 2

CD86 – Cluster de Diferenciação 86

CD206 – Cluster de Diferenciação 206

CL⁻ – Cloreto

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CPF – Córtex Pré-Frontal

CXCL1 – Quimiocina motivo C-X-C ligante 1

CXCL2 – Quimiocina Motivo C-X-C Ligante 2

CXCR2 – Receptor 2 de Quimiocina Motivo C-X-C

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

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

DP – Desvio Padrão

ECL – Quimioluminescência

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

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

GABA – Ácido γ -aminobutírico

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HRP – Enzima Peroxidase de Rábano

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

Iba1 – Molécula Adaptadora Ionizada de Ligação ao Cálcio 1

IFN- γ – Interferon Gama

IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1

IL-1 β – Interleucina-1 beta

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

IL-8 – Interleucina-8

IL-10 – Interleucina-10

iNOS – Óxido Nítrico Sintases Induzida

JNK – c-Jun N-terminal cinase

K⁺ – Potássio

KCC2 – Co-transportador de Potássio e Cloreto

K_{v7} - Canal de Potássio Dependente de Voltagem 7

K2p18.1 – Canal de Potássio

LaNEx – Laboratório de Neurociências Experimental

LED – Diodo Emissor de Luz (do inglês, *Light-Emitting Diode*)

M1 – Macrófago Fenótipo Pró-inflamatório

M2 – Macrófago Fenótipo Anti-inflamatório

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

MIA – Morte Indolor Assistida

MLSS – Estado Estável Máximo de Lactato Sanguíneo (do inglês, *Maximal Lactate Steady State*)

Na_v – Canal de Sódio Voltagem Dependente

NeuPSIG – Grupo de Interesse Especial Sobre Dor Neuropática

NF- κ B – Fator Nuclear κ B

NGF – Fator de Crescimento do Nervo

NMDA – N-metil D-Aspartato

NOS2 – Óxido nítrico sintase-2

PKM ζ – Proteína Cinase M ζ

PMSF – Fenilmetilsulfonilfluoreto

PPGCS – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

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

P2X4 – Receptores Ionotrópicos Purinérgicos

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno

RIPA – Radioimunoprecipitação

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento beta

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRPV1 – Receptor de Potencial Transitório 1

TrkB – Receptor de Tropomiosina Cinase B

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

WB – *Western Blotting*

5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)

5-HT3 – Receptor de 5-hidroxitriptamina Tipo 3

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo..... 51

Lista de figuras

Figura 1 – Alterações periféricas e centrais induzidas por lesão nervosa e os mecanismos de transmissão e modulação da dor 29

Figura 2 – Ativação das células gliais e a liberação de BDNF e suas ações após uma lesão de nervo periférico 32

Figura 3 – Desenho do estudo..... 45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
1.1.1	Dor neuropática	19
1.1.2	Fisiopatologia da dor neuropática após lesão nervosa periférica	23
1.1.2.1	Papel das citocinas e células imunológicas na dor neuropática	24
1.1.2.2	Papel das células gliais na dor neuropática	26
1.1.2.3	Papel das neurotrofinas na dor neuropática	29
1.1.3	Efeitos da fisioterapia aquática e exercício de natação em estudos clínicos	32
1.1.4	Efeitos do exercício físico de natação em modelos animais	36
2	OBJETIVOS	41
2.1	OBJETIVO GERAL	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	MÉTODOS	42
3.1	TIPO DE ESTUDO	42
3.2	MATERIAL E EQUIPAMENTOS	42
3.3	ANIMAIS	43
3.4	DELINEAMENTO DO ESTUDO E CÁLCULO DA AMOSTRA.....	43
3.5	ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS	46
3.5.1	Indução da lesão por esmagamento do nervo isquiático	46
3.5.2	Protocolo de exercício físico de natação	46
3.5.3	Mensuração do lactato sanguíneo	47
3.5.4	Avaliação da hiperalgesia mecânica	48
3.5.5	Teste do campo aberto	48
3.5.6	Teste de esquiva ao estímulo mecânico	49
3.5.7	Ensaio bioquímicos	49
3.5.7.1	Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima.....	50
3.5.7.2	Western Blotting.....	50
3.6	VARIÁVEIS DE ESTUDO	51
3.7	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	52
3.8	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	52

4	ARTIGO	53
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXO A – APROVAÇÃO CEUA UNISUL	71

1 INTRODUÇÃO

A dor é a conscientização do sistema nervoso central (SNC) de um dano tecidual real ou potencial e é sentida como uma experiência multidimensional, produzida por padrões característicos de impulsos nervosos gerados por uma rede neural amplamente distribuída no encéfalo. As dores agudas e seus mecanismos de transmissão sensorial são geralmente bem compreendidos pelos neurocientistas. Por outro lado, as síndromes de dor crônica, que geralmente são caracterizadas por dor intensa têm seus mecanismos pouco conhecidos^{1,2}. Nesse ínterim a dor neuropática, que é consequência de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial periférico ou central, foi o tema dessa pesquisa³. Hoje sabe-se que a dor neuropática não é simplesmente uma consequência da continuidade temporal dos sinais agudos nociceptivos, mas sim da função do sistema nervoso mal adaptada^{1,2}.

Na população geral estima-se que as taxas de incidência e prevalência da dor crônica variam entre 3 e 17%⁴. Um estudo que aplicou um questionário de dor neuropática resultou na prevalência de dor crônica de 42% e dentre eles 10% com características de dor neuropática⁹². A etiologia da dor neuropática é variada, bem como as manifestações clínicas, no entanto, o impacto na qualidade de vida dos portadores é de extrema gravidade⁴. A qualidade de vida desses pacientes é classificada em nível baixo, assim como os portadores de depressão, infarto recente do miocárdio ou diabetes mal controlado. Além disso, de acordo com um estudo realizado no Reino Unido⁶, onde foram aplicados questionários de qualidade de vida relacionados à saúde em 4.451 pessoas, 17% dos indivíduos com dor neuropática descreveram a qualidade de vida correspondente a “pior do que a morte”⁶.

Além da redução da qualidade de vida, saúde física e emocional, bem-estar e função social, a dor neuropática pode levar a comorbidades psicológicas, como transtornos do sono, depressão e ansiedade^{7,8}. Indivíduos acometidos por dor neuropática também utilizaram mais serviços de saúde, como visita a médicos neurologistas e tratamentos neurológicos. Em função disso, os custos em saúde pública com o tratamento da dor são elevados durante o primeiro ano após o diagnóstico e aumentam após um ano do surgimento desta. O impacto da dor e de seus custos afeta a economia global, visto que, dois terços dos custos totais estão associados a perda de produtividades destes indivíduos, gerando prejuízos

incalculáveis para o indivíduo, seus familiares e a sociedade^{9,10}. Apesar de não conhecermos esses dados no Brasil, nos Estados Unidos estima-se que o custo do sistema de saúde no gerenciamento da dor crônica ultrapasse US\$ 600 bilhões de dólares por ano, sendo maior que os gastos advindos de tratamento de doenças cardíacas, câncer e diabetes¹¹.

A dor neuropática é uma patologia de difícil tratamento, visto que a maioria dos medicamentos utilizados no seu manejo foram desenvolvidas para o tratamento de outras doenças, como os antidepressivos e os antiepilépticos, trazendo diversos efeitos colaterais¹². O tratamento medicamentoso utilizado na dor neuropática possui entre 30 a 50% de eficácia¹³. Dentre os medicamentos conhecidos, podemos citar a amitriptilina, onde seus efeitos colaterais estão ligados aos efeitos anticolinérgicos, ou seja, constipação, boca seca, hipotensão postural e retenção urinária; os gabapentínicos que possuem efeitos colaterais como tontura, sedação e edema periférico; a venlafaxina que possui como efeito colateral as náuseas; os opioides, que colateralmente geram constipação, náuseas e vômitos; a lidocaína e a capsaicina com efeitos colaterais de eritema e prurido e, por fim a neurotoxina, que possui como efeito colateral a dor no local da aplicação^{12,14,15}.

Na fisiopatologia da dor neuropática as células gliais têm um papel central, que vai além das suas funções fisiológicas de proporcionarem suporte e proteção aos neurônios, assegurando a homeostase^{1,2}. Em mudanças patológicas, as células gliais são modificadas em sua estrutura e função e contribuem para a neuroinflamação¹⁶⁻¹⁸. A neuroinflamação, por sua vez, pode estar relacionada a alterações no sistema imunológico, como as infecções virais e bacterianas^{16,19}; lesões neuronais, como trauma ou acidente vascular cerebral^{16,20}; fatores genéticos; síndromes inflamatórias, sendo elas artrite e esclerose múltipla^{16,21}; e ainda, toxinas ambientais como metais pesados e compostos organofosforados^{16,22}. Estas alterações podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica possibilitando a infiltração de linfócitos e macrófagos na região do parênquima encefálico¹⁶. Esse processo é agravado com a resposta inflamatória que provocará danos teciduais, e conseqüentemente, será a gênese da neuroinflamação. Acredita-se então que a neuroinflamação crônica seja a base para a morte neuronal e para a disfunção sináptica^{1,23}. Apesar dos desafios, o progresso no entendimento da fisiopatologia multifatorial da dor neuropática está estimulando o desenvolvimento de novos procedimentos de diagnóstico e

intervenções personalizadas, que enfatizam a necessidade de uma abordagem multidisciplinar para o tratamento dessa disfunção.

O conhecimento sobre a dor neuropática e o entendimento dos seus mecanismos neurobiológicos pelos profissionais da área da saúde são estratégias significativas para prevenir e amenizar a incidência, prevalência e o impacto da dor neuropática na população, buscando o tratamento mais adequado para estes indivíduos. Nesse sentido, a fisioterapia aquática e o exercício físico de natação destacam-se por seus benefícios provenientes dos princípios físicos da água e seus efeitos fisiológicos, auxiliam na prevenção e no tratamento de diversas patologias, contribuindo para a neuroplasticidade e para a recuperação neurológica. Os exercícios aquáticos podem contribuir de diversas formas, a flutuabilidade adaptará o ambiente para que o indivíduo consiga realizar uma tarefa em que o solo não seja possível. Ou até mesmo pode proporcionar um desafio na execução do exercício ou sua facilitação, além de associar o estímulo sensorial²⁴.

Diferentes estudos²⁵⁻³⁴ demonstraram os diversos benefícios do exercício físico para pacientes com dor neuropática, e dentre as modalidades encontradas a natação foi eficaz como terapia complementar, apresentando resultados significativos no tratamento da dor, reduzindo a alodinia e a hiperalgesia, e conseqüentemente proporcionando uma melhor qualidade de vida para estes indivíduos. Por isto, justifica-se a realização desse estudo utilizando-se um modelo animal para reproduzir sintomas sensoriais, além do comprometimento afetivo e cognitivo, que estão entre as comorbidades mais comuns da dor neuropática³⁵, juntamente da aplicação do exercício físico como intervenção, para compreender melhor o mecanismo de ação dessa terapia sobre a dor e interações neuroimunes após lesão nervosa periférica. Com base no descrito, questiona-se: um protocolo de três semanas de natação é capaz de melhorar os aspectos comportamentais sensoriais, cognitivos e emocionais da dor neuropática e interferir na neuroinflamação do córtex pré-frontal (CPF) em camundongos com lesão de nervo periférico?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Dor neuropática

O sistema somatossensorial é responsável pela percepção do toque, temperatura, dor, pressão, posição, vibração e movimento. Os receptores somatossensoriais estão presentes na pele, articulações, músculos e fáscias, e são termorreceptores, mecanorreceptores, quimiorreceptores, receptores de prurido e nociceptores, que são responsáveis pela transdução dos estímulos e transmissão de sinais para a medula espinal. A transmissão sensorial é enviada para o tálamo e dali para diferentes regiões do encéfalo².

Em circunstâncias de lesões ou doenças no sistema somatossensorial a transmissão de sinais sensoriais pode sofrer alterações e distúrbios desde a sua terminação periférica até o seu trajeto central, na medula espinal e encéfalo². A dor neuropática é consequência dessas lesões ou doenças do sistema somatossensorial central ou periférico (incluindo fibras A β , A δ e C)³ e é uma condição crônica complexa, caracterizada por uma ampla gama de sintomas sensoriais, cognitivos e afetivos^{2,3}. Conceitualmente entendemos dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a, ou semelhante à associada a um dano tecidual real ou potencial³.

O comprometimento sensorial na dor neuropática está associado a alterações plásticas ocorridas nas regiões responsáveis pela transmissão da dor, como nociceptores periféricos, corno dorsal da medula espinal, áreas corticais e subcorticais³⁶. Outras áreas como o CPF medial³⁷, tálamo³⁸ e amígdala³⁹ estão associadas ao comprometimento afetivo e emocional da dor crônica³⁵.

Dentre as etiologias da dor neuropática inclui-se infecções, compressão nervosa, cirurgia, inflamação, radiação, anormalidades metabólicas, neurotoxinas, tumor, quimioterapia e trauma⁴⁰. As lesões nervosas traumáticas são comumente encontradas na prática clínica⁴¹, apresentam-se em decorrência de lesões no esporte como compressão, alongamento ou por uso excessivo⁴²; cirurgias e procedimentos anestésicos⁴³; e também lesões por esmagamento causada por forças compressivas, fraturas e hematomas⁴¹. Ao nível patológico, pode-se citar alterações no sistema somatossensorial hereditárias como a amiloidose, o diabetes, o hipotireoidismo e a deficiência de vitaminas. Nas lesões de causas infecciosas temos a polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda e a polineuropatia causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Toxinas como arsênico, chumbo e dinitrofenol também podem causar danos ao sistema somatossensorial. Alterações vasculares encefálicas isquêmicas ou hemorrágicas, assim como doenças neuroinflamatórias

como esclerose múltipla e mielite, e ainda, doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson e doença de Alzheimer podem levar a dor neuropática⁴⁴.

As lesões nervosas periféricas, objeto de estudo desse projeto, são divididas em três categorias de acordo com o grau de gravidade: neuropraxia, axonotmese e neurotmese. A neuropraxia é definida como o grau mais leve, há perda da continuidade nervosa e a perda funcional é transitória. O nervo afetado não transmite os impulsos elétricos de forma eficaz, assim os segmentos corporais respectivos a ele ficam paralisados até que a remielinização ocorra. A recuperação completa ocorrerá em dias ou semanas⁴¹. A axonotmese, caracteriza-se por uma lesão no axônio e na bainha de mielina, mantendo a integridade do tecido conjuntivo externo do nervo. Sendo assim, o prognóstico é favorável⁴¹. A neurotmese é o grau mais grave, há desconexão completa entre os segmentos do nervo, causando perda funcional total e a recuperação sem a intervenção cirúrgica normalmente não ocorre. Diante disto, a capacidade de regeneração e recuperação do nervo é diretamente dependente do grau da lesão^{6,11}.

Estudos epidemiológicos apontam a heterogeneidade dos dados de prevalência e incidência da dor neuropática, por abordarem diferentes definições e metodologias^{2,4,46}. No estudo de Posso e colaboradores (2016)⁴ estima-se que a dor neuropática esteja presente em 35% de todas as síndromes dolorosas. No Brasil, a dor crônica é comum com prevalência de 41% da população e estima-se que destes, 10% sejam portadores de dor neuropática⁴. Além disto, no estudo de Dieleman e colaboradores (2008)⁴⁶, mostrou que a nível mundial a dor neuropática possui uma prevalência de cerca de 17% e os dados incidentes apontam para 0,82% da população⁴⁶.

É possível diminuir os números e o impacto da dor neuropática, prevenindo e identificando os fatores de risco para lesões e doenças do sistema somatossensorial e melhorando os tratamentos disponíveis. Dentre os fatores de risco estão idade avançada, sexo feminino, sedentarismo, fatores psicológicos como a perda de um familiar e fatores genéticos^{4,40}. Os sinais e sintomas atuam de forma a auxiliar na identificação dos mecanismos fisiopatológicos da dor neuropática, favorecendo seu reconhecimento e tratamento. Indivíduos relatam sentir dor espontânea contínua ou intermitente, que independe de um estímulo nocivo e varia em intensidade. Além da dor espontânea surgem sintomas como a alodinia, que se caracteriza pela dor a um estímulo inócuo, e a hiperalgesia, que é a dor amplificada frente a um estímulo

normalmente doloroso. Ainda, há relatos de indivíduos que apresentam disestesias e parestesias, com sensação de dormência, formigamento e agulhadas, por exemplo⁴⁰.

As alterações fisiológicas que a dor neuropática promove são causas significativas de morbidade e incapacidade, prejudicando o portador, a família e sociedade. Também, a dor é motivo de enorme impacto na qualidade de vida dos seus portadores, por ser debilitante e normalmente estar associada com ansiedade e depressão⁴⁷. Devido a condição, os indivíduos com dor neuropática são menos capazes, ou até mesmo incapazes, de realizar diversas tarefas do dia a dia. Além disso, o tratamento da dor neuropática é complexo e oneroso também economicamente, para o paciente e para o sistema de saúde⁴⁸.

A primeira linha de tratamento farmacológico para a dor neuropática, segundo pesquisadores do Grupo de Interesse Especial Sobre Dor Neuropática (NeuPSIG) da Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain - IASP*)⁴⁹, são fármacos como a pregabalina, gabapentina, antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos de recaptção de serotonina-noradrenalina. Adesivos contendo capsaicina, lidocaína e tramadol são os medicamentos de segunda escolha. E ainda, opioides como morfina e oxicodona, e toxina botulínica são os medicamentos escolhidos como a terceira linha no tratamento da dor neuropática periférica e central^{12,49}.

A abordagem tradicional para o manejo de um paciente com dor neuropática consiste em iniciar o tratamento com terapias farmacológicas e terapias complementares conservadoras, como a fisioterapia e terapia psicológica, antes de intervenções como bloqueios nervosos e neuromodulação^{2,13,49}. No entanto, apesar da ampla gama de fármacos disponíveis, eles são efetivos em menos de 50% dos indivíduos, e o uso indiscriminado de medicação juntamente aos efeitos adversos graves desses medicamentos, principalmente dos opioides, instigam a ciência na busca de novas estratégias terapêuticas não farmacológicas para o manejo da dor neuropática. Embora muito conhecimento já se tenha nesse campo da dor neuropática, ainda faltam estudos pré-clínicos e clínicos para ajudar a orientar os profissionais de saúde a buscarem um tratamento ideal para esses indivíduos. Diante disto, justifica-se a importância de um maior entendimento a cerca da eficácia da atuação sobre a fisiopatologia da dor neuropática e das interações neuroimunes que ocorrem após a lesão nervosa periférica.

1.1.2 Fisiopatologia da dor neuropática após lesão nervosa periférica

As lesões no sistema nervoso periférico (SNP) alteram as propriedades elétricas dos nervos sensoriais, gerando um desequilíbrio entre a sinalização central excitatória e inibitória, de modo que prejudica a sinalização dos interneurônios inibitórios e os sistemas de controle descendente da dor². Após um fenômeno sensorial doloroso há uma sequência de eventos que irão transformar os estímulos ambientais em potenciais de ação neuronais, que são transferidos do SNP para o SNC. As fibras A- δ e fibras C tem a propriedade de veicular as informações dos nociceptores para o SNC⁵⁰.

Quando há lesão no axônio, a dor na ausência de qualquer estímulo externo pode ocorrer, originada pela atividade espontânea (potenciais ectópicos) ao longo das fibras nervosas nociceptivas A δ e C, nas raízes nervosas e nos gânglios sensoriais^{50,51}. A atividade ectópica tem origem alguns dias após a lesão nervosa e aumenta durante a primeira semana, decaindo progressivamente⁵². Esta atividade ectópica pode surgir quando os potenciais de ação dos neurônios aferentes primários prolongam-se além do período refratário absoluto, fazendo com que haja uma nova excitação da membrana neuronal^{50,52}. Essas alterações neuronais podem resultar de mediadores liberados pelos próprios neurônios lesionados, células imunológicas, células de Schwann desnervadas e do tecido alvo⁵³.

A atividade ectópica nos neurônios aferentes primários parece ter papel fundamental para a fisiopatologia da dor neuropática e sensibilização central, seguida pela lesão no SNP. Em relação a esses disparos espontâneos, estudos de eletroneuromiografia demonstraram o envolvimento principalmente de fibras C nociceptivas⁵⁴. A lesão nervosa muda drasticamente a expressão, distribuição e fosforilação de muitos canais iônicos em neurônios sensoriais, levando a alterações nas propriedades intrínsecas da membrana e à geração de oscilações do potencial da membrana, resultando em disparos rítmicos na ausência de um estímulo. Evidências mostraram que ocorre uma redução da expressão de canais de potássio de repouso (K2p18.1) entre 30 e 40% e canais de potássio dependente de voltagem 7 (Kv7), levando a uma despolarização constante do potencial de membrana neuronal pela redução da corrente de potássio (K⁺), isso, em conjunto com as oscilações sublimiáres do potencial de membrana, amplamente estimuladas pelo componente persistente da corrente de sódio (mediadas por canal de sódio controlado por voltagem Na_v1.3,

Nav1.6, Nav1.7 e Nav1.9) podem ser os principais contribuintes para a descarga ectópica dos neurônios⁵³. O mecanismo exato dessa mudança nos perfis dos canais de sódio não é bem compreendido, mas provavelmente envolve vias mediadas pelo fator de necrose tumoral (TNF)^{55,56}.

A excitabilidade aumentada dos neurônios espinais causa uma produção exacerbada de respostas, fazendo com que as fibras aferentes A δ sejam mais facilmente ativadas, e conseqüentemente, contribuindo para a sensibilização central^{2,57,58}. As fibras aferentes periféricas liberam de forma simultânea aminoácidos excitatórios como o glutamato e neuropeptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), causando alterações pós-sinápticas nos neurônios nociceptivos de segunda ordem, promovendo um excesso de sinalização excitatória devido à fosforilação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Outra alteração causada pela hiperexcitabilidade dos neurônios espinais é a perda de interneurônios inibitórios que liberam ácido γ -aminobutírico (GABA) dificultando a regulação das sinapses excitatórias no corno dorsal da medula espinal^{2,59}. Estas alterações medulares possivelmente explicam parte do mecanismo de alodinia e hiperalgesia, no entanto, alterações funcionais e morfológicas em células gliais, gerando um estado de neuroinflamação, também irão contribuir para o desenvolvimento da hipersensibilidade^{2,59-61}.

1.1.2.1 Papel das citocinas e células imunológicas na dor neuropática

Após a lesão nervosa periférica, há uma reação imunológica no local da lesão, na medula espinal e no gânglio sensorial do nervo espinal, com infiltração e ativação de células imunes e interações neuroimunes, que desempenham um papel importante no desenvolvimento da dor^{62,63}. Os macrófagos residentes nos tecidos e hematogênicos, estão entre as primeiras células a se ativarem e contribuir para o desenvolvimento da dor e inflamação^{62,64}. Os macrófagos, semelhante às micróglias, podem desenvolver fenótipos funcionais dependentes do ambiente. Desta forma, os macrófagos podem ser do tipo M1, o qual são ativados classicamente e liberam citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e TNF que conseqüentemente ativarão nociceptores envolvidos na produção de dor e hiperalgesia^{62,65}. Os macrófagos do tipo M2 são ativados de forma alternativa e

liberam citocinas anti-inflamatórias como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10)^{62,64}. O estudo de Yu e colaboradores (2020)⁶⁶ mostrou que após a lesão do nervo poupado há indução da expansão dos macrófagos no gânglio sensorial do nervo espinal, mas não no nervo lesionado, contribuindo para o início da hipersensibilidade mecânica⁶⁶. Bobinski e colaboradores (2018)⁶² demonstraram que macrófagos M1 ainda estão infiltrados no nervo 14 dias após a lesão por esmagamento do nervo isquiático, e os mediadores liberados por essas células contribuem para a hiperalgesia⁶².

A IL-6 apresenta caráter pró-inflamatório e foi demonstrado o seu papel facilitatório na alodinia mecânica em camundongos *knockout* para IL-6 submetidos a ligadura e transecção de L5⁶⁷. Portanto, a redução de IL-6 observada no CPF dos animais submetidos a natação poderia contribuir para a redução da neuroinflamação e da dor neuropática nesse estudo. Também de caráter pró-inflamatório, o TNF e a IL-1 β , tem como habilidade a capacidade de induzir uma cascata de citocinas, estão associadas diretamente com a dor neuropática^{63,68,69}. Foi demonstrado que no modelo de lesão por esmagamento do nervo isquiático houve aumento das concentrações de TNF e IL-1 β no nervo lesionado, na medula espinal e no tronco encefálico 35 dias após lesão nervosa⁷⁰. No modelo de lesão por constrição crônica do nervo isquiático houve aumento de TNF e ativação da via intracelular do fator nuclear κ B (NF- κ B), tanto no nervo isquiático quanto no tronco encefálico após 14 dias após a lesão⁷¹. Estudos observaram que níveis elevados de IL-1 β têm sido encontrados no hipocampo, tronco cerebral e CPF de animais com dor neuropática^{69,72,73}. Além disso, a administração de IL-1 β provoca alodinia em ratos⁷⁴. E por fim, ainda de caráter pró-inflamatório, o interferon-gama (IFN- γ) também foi demonstrado como sendo regulado positivamente na medula espinal, em um modelo experimental de neuropatia periférica induzida por quimioterapia⁷⁵.

Em relação às citocinas anti-inflamatórias com potencial modulador em modelos animais de dor neuropática podemos destacar a IL-4, uma citocina com diversas funções imunológicas, como a estimulação de células B, a proliferação e a supressão da ativação de macrófagos M1, bem como, a indução da polarização de macrófagos para o fenótipo M2. Sugere-se que a IL-4 possui um papel antinociceptivo em modelos de dor aguda e crônica⁶³. Por exemplo, o estudo de Bobinski e colaboradores (2018)⁶² mostrou-se que o exercício físico em esteira aumentou as concentrações de IL-4 no nervo isquiático e na medula espinal, sugerindo que a IL-4

medeia a analgesia após exercício físico⁶². O papel da IL-4 na analgesia induzida pelo exercício físico foi confirmado, visto que animais exercitados, *knockout* pra essa interleucina, não apresentavam o mesmo efeito analgésico observado em animais selvagens que tiveram o nervo isquiático lesionado⁶².

A IL-10 também apresenta ação anti-inflamatória em modelos de lesão de nervo poupado⁷⁶, por meio da supressão de citocinas pró-inflamatórias e da diminuição do recrutamento e da ativação das células gliais no local da lesão e na medula espinal⁶³. Um estudo⁷⁷ mostrou que a IL-10 reduz significativamente a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica em um modelo animal de neuropatia diabética dolorosa e, ainda, a redução de IL-10 nos neurônios do gânglio sensorial do nervo espinal contribuiu para o aumento de citocinas pró-inflamatórias⁷⁷. Em um modelo de lesão por esmagamento de nervo⁷⁰, observou-se que houve um aumento de IL-10 após a lesão no nervo, mas a nível de medula espinal não houve alterações⁷⁰. Outro estudo⁷⁸ que examinou a expressão e o papel da IL-10 após a lesão por esmagamento do nervo isquiático em camundongos, concluiu que em camundongos *knockout*, a ausência de IL-10 prejudicou a regeneração dos axônios e possui um efeito negativo na recuperação motora e sensorial. Esses achados mostram que a IL-10, que é expressa principalmente em macrófagos no nervo isquiático de camundongo pós lesão de nervo, desempenha uma função fundamental na regulação de características da resposta pró-inflamatória, atuando na resolução da inflamação, regeneração de axônios e recuperação motora e função sensorial⁷⁸.

1.1.2.2 Papel das células gliais na dor neuropática

As funções das células gliais estão além de proteção imunológica, sendo determinantes na geração de síndrome de dor persistente⁷⁹. As células gliais participam ativamente dos processos fisiológicos na transmissão sináptica dos neurônios, além de terem importante papel na manutenção da homeostase, na regulação da concentração de neurotransmissores extracelulares e equilíbrio iônico⁸⁰. Na fisiopatologia da dor neuropática as células gliais promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios, reduzindo o limiar de ativação neuronal e contribuindo para a sensibilização central, intensificando a propagação de dor por toda a via nociceptiva³⁴. Diferente da dor aguda, que é uma resposta adaptativa e protetora, a dor neuropática gera a excitação dos neurônios nociceptivos primários e secundários

de forma contínua e prolongada, amplificando a dor além do seu estímulo periférico^{81,82}.

No processo de dor patológica as micróglia são primeiramente ativadas por mediadores liberados pelos neurônios aferentes primários, tais como a fractalcina e a adenosina trifosfato (ATP), essas moléculas guiam a quimiotaxia, proliferação e ativação microglial^{82,83}. Posteriormente, a intensa liberação de mediadores pró-inflamatórios, neurotransmissores excitatórios e outros neuromoduladores liberados pelos neurônios sensoriais e pela micróglia reativa, ativam astrócitos que são conhecidos por manterem a dor crônica. Após uma lesão nervosa periférica foi demonstrado que há um aumento de liberação de citocinas pró-inflamatória no SNC (IL-1 β e TNF) e quimiocinas (quimiocina motivo C-X-C ligante 2 (CXCL2) e quimiocina motivo C-C ligante 2 (CCL2)) derivadas de neurônios e células gliais⁸⁴.

Zhang e colaboradores (2013)⁸³, demonstraram que quimiocinas como a quimiocina motivo C-X-C ligante 1 (CXCL1), produzida pelos astrócitos, possui papel fundamental na manutenção da sensibilização central e na dor neuropática, após ligadura de nervo espinal. Primeiramente observaram que a ligadura do nervo regulou a liberação das quimiocinas, de forma lenta e persistente, em astrócitos espinais dependentes da via TNF/c-Jun N-terminal cinase (JNK). Posteriormente, observaram que a inibição da quimiocina CXCL1 reverteu de forma parcial a hipersensibilidade à dor. Notaram também que a aplicação da quimiocina CXCL1 induziu hiperalgisia ao calor por meio de ativação do receptor 2 de quimiocina motivo C-X-C (CXCR2), além de induzir a sensibilização central. Juntos, esses achados demonstraram que a lesão do nervo regula a expressão e liberação de quimiocinas na medula espinal, aumentando a dor neuropática por meio de interações entre neurônios e células gliais⁸³.

A micróglia ativada no SNC, assim como os macrófagos da periferia estão condicionados a exibirem um fenótipo pró-inflamatório (M1) ou anti-inflamatório (M2), durante condições de neuroinflamação. Quando há uma lesão nervosa periférica as micróglia alteram seu fenótipo para M1, torna-as fagocitárias⁸⁵⁻⁸⁷, aumentam a imunorreatividade para Iba-1, CD11b, cluster de diferenciação 86 (CD86), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e expressam citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF. Nos modelos de lesão de constrição crônica do nervo, ligadura do nervo espinal e lesão do nervo poupado, o CD11b foi encontrado na medula espinal, 3 dias após a lesão, aumentando até o 7º dia e a redução iniciou a partir do 14º dia⁸⁸⁻⁹¹.

A ativação dos astrócitos e micróglia por meio de neuromoduladores e neurotransmissores desencadeia e mantém efeitos patológicos como a hiperexcitabilidade neuronal, o aumento da expressão de receptores nos neurônios do gânglio sensorial do nervo espinal, a neurotoxicidade e a neuroinflamação em todo o trajeto sensorial da medula espinal ao encéfalo⁸¹. Nesse sentido, as células gliais possuem papéis na modulação da função neuronal e entende-se que a micróglia é responsável pelo estabelecimento da dor neuropática, já que está condicionada a exibir um fenótipo pró-inflamatório, observado em condições de lesões neuropáticas ou neurodegenerativas. Os astrócitos, por outro lado, participam principalmente da manutenção do estado de dor persistente⁸¹, possuem como função a limpeza de moléculas tóxicas ou moléculas que estão em excesso, por meio do sistema glinfático⁹², contribuindo para a homeostase local, além disso, são moduladores da função sináptica^{93,94}. Na lesão nervosa, a ativação dos astrócitos em modelos animais de dor ocorre dias após a lesão e regulam de forma positiva a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), vimentina e o peptídeo de ligação ao cálcio S110B^{91,95-97}.

Posteriormente a ativação, essas células produzem produtos que são secretados de forma irregular e aumentada, contribuindo para alterações nos mecanismos de captação e reversão dos sistemas de transportadores, prejudicando as funções homeostáticas, e contribuindo para a disfunção do circuito neuronal. Diante disto, as células ativadas irão induzir alterações neuroanatômicas e neurofisiológicas, o que leva a anormalidades na transmissão sensorial. A ativação das células gliais de forma disfuncional após lesão do nervo periférico, relaciona-se diretamente com os sintomas de dor neuropática, como a alodinia mecânica e hiperalgesia térmica⁸⁰.

A informação de dor é conduzida da medula espinal ao encéfalo pela via espinotalâmica. O encéfalo então, após todos esses processos de sensibilização neuronal receberá as mensagens sensoriais de forma alterada e anormal. As fibras espinotalâmicas irão projetar-se da medula espinal, passando pelo bulbo, ponte e mesencéfalo sem realizar sinapses, até chegarem ao tálamo. Posteriormente, o tálamo irá projetar estas informações recebidas de forma alterada para diversas áreas do córtex, além das regiões límbicas, que são responsáveis pelo processamento da dor, ansiedade, depressão e problemas do sono². Resumidamente, as alterações periféricas e centrais induzidas pela lesão nervosa e os mecanismos de transmissão e modulação da dor estão destacados na figura 1.

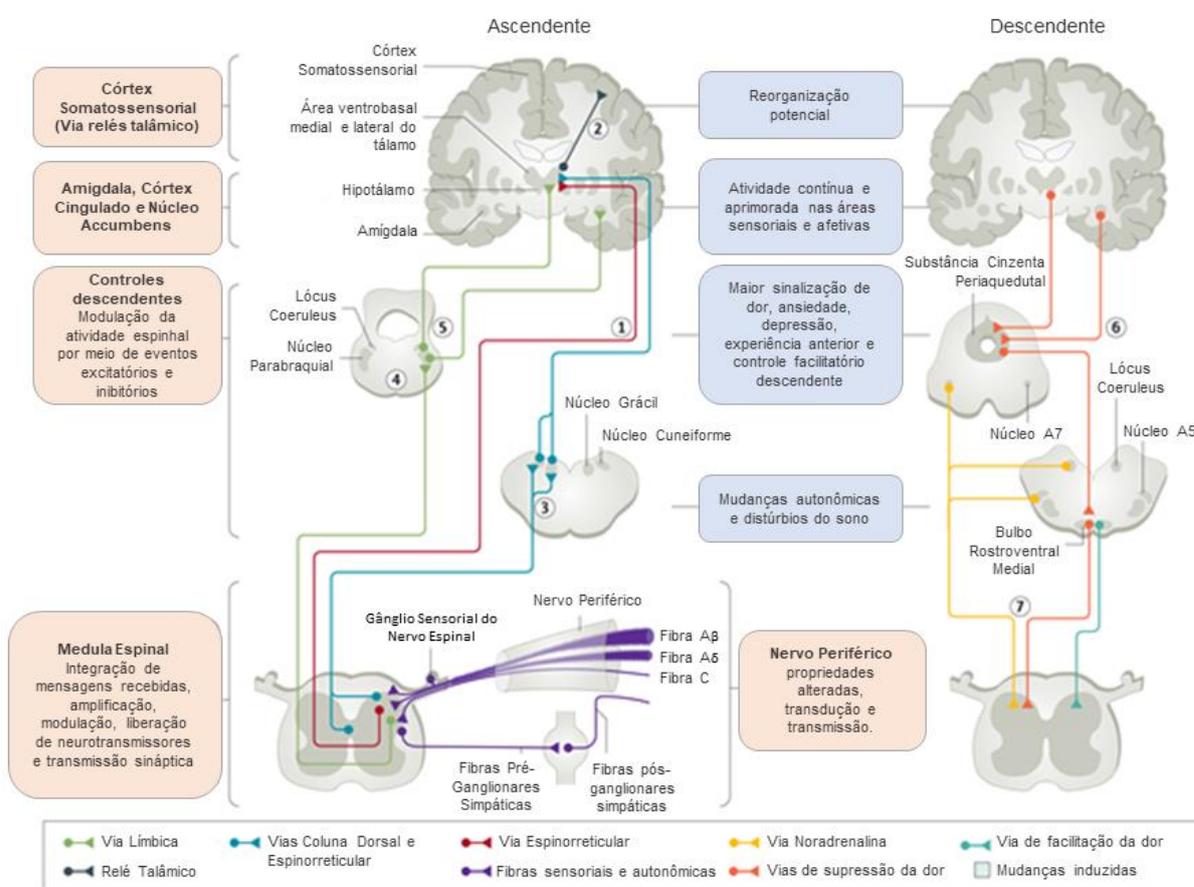


Figura 1. Alterações periféricas e centrais induzidas por lesão nervosa e os mecanismos de transmissão e modulação da dor.

A lesão das fibras sensoriais periféricas (fibras A β , A δ e C) altera a transdução e a transmissão da dor. Essas alterações afetam a atividade da medula espinal, levando a um excesso de excitação associado a uma perda de inibição. Nas vias aferentes ascendentes, os componentes sensoriais da dor são: (1) via espinotalâmica projetando para as áreas ventromedial e ventrolateral do tálamo, que então se projetam para o (2) córtex somatossensorial, permitindo que a localização e a intensidade da dor sejam percebidas. (3) A medula espinal também apresenta projeções espinorreticulares que seguem da coluna dorsal até os núcleos gracil e cuneiforme. Outras projeções límbicas se projetam da medula espinal e fazem sinapse no núcleo parabraquial (4) antes de entrar em contato com o hipotálamo e a amígdala, onde a função autonômica central, o medo e a ansiedade são processados (5). As vias eferentes descendentes da amígdala e do hipotálamo (6) conduzem as informações para a substância cinzenta periaquedutal, o locus coeruleus, os núcleos A5 e A7 e o bulbo rostrorventral medial. Essas áreas do tronco encefálico se projetam para a medula espinal liberando noradrenalina (inibição via adrenoreceptores α_2) e, na neuropatia, há perda desse controle e aumento da excitação via liberação de serotonina, ativando receptores 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT₃) (7), na medula espinal.

Fonte: Adaptado de Colloca et al. (2017)².

1.1.2.3 Papel das neurotrofinas na dor neuropática

As neurotrofinas são uma família de proteínas relacionadas com a regulação do crescimento, manutenção e apoptose de neurônios no sistema nervoso, e além de funções fisiológicas, têm papel importante após lesões neuronais^{98,99}. Neurotrofinas,

como o fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), interagem com receptores de tropomiosina cinase (Trk), TrkA e TrkB, respectivamente^{100,101}. As neurotrofinas ativam cinases, que alteram a expressão, a modificação pós-transducional e o tráfego do canal de cátions receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1) e de canais de sódio dependentes de voltagem^{102,103}. Além disso, a expressão de canais de potássio dependentes de voltagem é diminuída pela ativação de proteína cinase Mζ (PKMζ) mediada pelos receptores de neurotrofinas. Há também, evidências de que o NGF e o BDNF, atuam na mediação e modulação da dor ao nível periférico e central. O NGF foi encontrado aumentado após lesão do SNP, no sítio da lesão e no coto distal, atuando como mediador periférico da dor^{104–106}. O NGF modula a dor através do BDNF, que é liberado nos terminais espinais dos nociceptores, atuando na modulação e alteração dos sinais nociceptivos¹⁰⁷. O BDNF atua na modulação sináptica dos neurotransmissores, regulando a excitabilidade dos neurônios¹⁰⁸.

O BDNF é expresso no desenvolvimento de neurônios sensoriais envolvidos na transdução de estímulos mecânicos, como os corpúsculos de Meissner e o corpúsculo de Paccini^{107,109}. Essa neurotrofina é sintetizada por neurônios sensoriais de pequeno e médio diâmetro localizados no gânglio sensorial do nervo espinal, após a sua síntese é transportado do corpo celular destes neurônios para os terminais centrais no corno dorsal da medula espinal, nas lâminas I e II, agindo nos receptores trkB^{107,108}.

Na dor neuropática, o BDNF localizado nos neurônios sensoriais, sofre um desajuste de maneira dependente da lesão¹¹⁰. Por exemplo, na axonotmese, o BDNF é diminuído em neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, mas aumentado em neurônios de médio e grande diâmetro^{107,111}, dessa forma, o BDNF atuaria como neuromodulador quando liberado por neurônios nociceptivos de pequeno diâmetro, sendo fundamental para as vias de dor^{112,113}.

Além dos neurônios sensoriais, as células gliais quando reativas também sintetizam e liberam fatores neurotróficos. Kitayama e colaboradores (2016)¹¹⁴, demonstraram que animais com dor neuropática após lesão medular apresentaram aumento da expressão de BDNF derivado de astrócitos e redução da expressão do co-transportador de K⁺ e cloreto (Cl⁻) (KCC2) na medula espinal. A liberação de BDNF por astrócitos é estimulado por citocinas pró-inflamatórias que aumentam após a lesão.

O trabalho pioneiro de Coull (2005)¹¹⁵ mostrou que a micróglia estimulada por ATP derivado de neurônios ativa os receptores ionotrópicos purinérgicos (P2X4), que por sua vez leva à liberação de ATP microglial e do BDNF. O BDNF regula negativamente o KCC2 através da ativação de seu receptor TrkB^{116,117}. Este co-transportador controla o gradiente intracelular de Cl⁻ nos neurônios, assim, as correntes GABA inibitórias nos neurônios do corno dorsal da medula espinal tornam-se despolarizantes e excitatórias, causando conseqüentemente a sensibilização à dor^{117,118}. Zhang e colaboradores (2013)¹¹⁷ verificaram que na dor neuropática, o KCC2 mantém o gradiente de Cl⁻ por extrusão de Cl⁻, mantendo a baixa concentração intracelular, inibindo a corrente de Cl⁻ que flui através de receptores de GABA¹¹⁷. No mesmo estudo mostrou-se um aumento de BDNF e a dor neuropática foi revertida pela inibição de TrkB, sugerindo que o BDNF esteja envolvido na deficiência de GABA mediada por KCC2 e confirmando que a hiperexcitabilidade dos neurônios do tronco encefálico está envolvida nos mecanismos de sensibilização à dor.

Além dos mecanismos já descritos, o aumento da liberação de BDNF após a lesão de nervos espinais também está relacionado ao aumento da excitabilidade de neurônios das vias nociceptivas por potencializar a neurotransmissão excitatória glutamatérgica. O BDNF através da sua ligação com o receptor TrkB promove a fosforilação das subunidades NR2A, NR2B e NR1 do receptor de glutamato NMDA, aumentando a sua atividade^{119,120}, além de regular a expressão de genes relacionados à dor, tais como c-fos, c-Jun, Krox-24 e CREB¹²¹⁻¹²⁴.

Diante de todas as mediações anteriormente citadas, na qual as neurotrofinas, destacando-se o BDNF, participam dos mecanismos que geram dor após a lesão nervosa periférica, justifica-se a melhor investigação dessa neurotrofina na fisiopatologia da dor neuropática, bem como no mecanismo de ação da analgesia gerada pela natação. A figura 2 destaca a ativação de células gliais e a liberação de BDNF e suas ações, após uma lesão de nervo periférico.

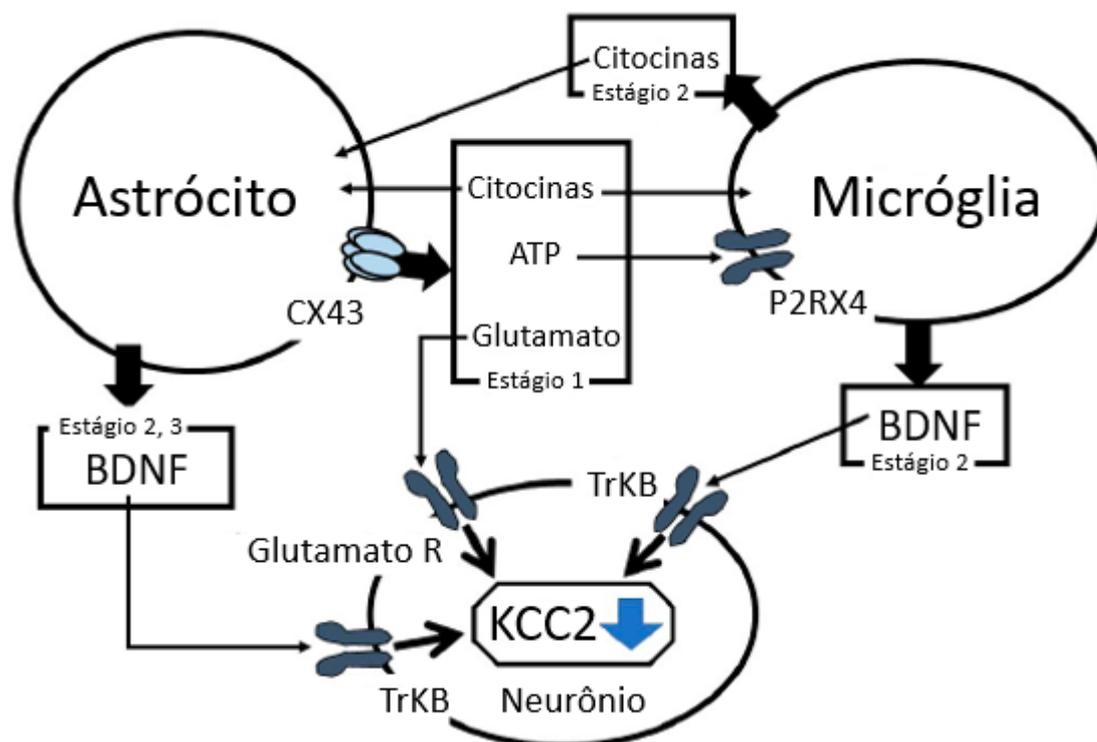


Figura 2. Ativação das células gliais.

Após uma lesão nervosa, no estágio 1, os astrócitos irão liberar ATP e citocinas pró-inflamatórias, ativando a micróglia e dando início a uma estimulação astrocitária. O astrócito medeia a liberação de glutamato, este regula as funções de KCC2 por meio do controle do estado de fosforilação de KCC2. No estágio 2, as micróglia são ativadas e suprimem a expressão de KCC2 por meio da reação em cascata BDNF-TrkB-KCC2, promovendo a ativação de astrócitos. No estágio 3, as citocinas pró-inflamatórias liberadas da micróglia e dos astrócitos estimulam os astrócitos a aumentar a produção de BDNF, aumentando a reação em cascata BDNF-TrkB-KCC2. Então, os astrócitos modulam as funções do KCC2 por meio de várias reações e desempenham um papel importante no início e no desenvolvimento da dor neuropática.

Fonte: Adaptado de Kitayama et al. (2020)¹²⁵.

1.1.3 Efeitos da fisioterapia aquática e exercício de natação em estudos clínicos

O tratamento da dor crônica neuropática é um desafio do ponto de vista clínico, visto que um indivíduo pode ter múltiplos mecanismos de dor ativados e, até mesmo indivíduos com o mesmo diagnóstico, podem apresentar diferentes mecanismos contribuintes para a sua dor¹²⁶. O campo do tratamento da dor, por meio da fisioterapia têm evoluído ao longo dos anos e possui diversas terapias que são adaptadas para cada indivíduo, dentre elas, o exercício físico. Este já se mostrou capaz de alterar o mecanismos da dor neuropática¹²⁷ resultando em analgesia^{62,128}, além de restauração da função motora e nervosa⁷⁰ após lesões neuronais.

A fisioterapia busca reparar, além da dor, as sequelas das lesões do SNP, buscando a funcionalidade e independência do indivíduo. Há diversas abordagens terapêuticas como: cinesioterapia passiva e ativa, eletroterapia, treinamento de habilidades funcionais, técnicas específicas de facilitação neuromuscular proprioceptiva e exercícios terapêuticos. Terapias em ambiente aquático também são bastante utilizadas, como os métodos de Halliwick, uma abordagem neuromuscular que envolve movimentos para controle de tronco e equilíbrio, visando a qualidade do movimento¹²⁹, anéis de Bad Ragaz que visa a melhora da força muscular e equilíbrio¹³⁰, Watsu que incorpora alongamentos passivos e sequências de movimentos passivos de membros, cabeça e pescoço¹³¹ e o exercício de natação¹³².

O exercício físico é considerado toda atividade física que envolve movimento corporal com gasto energético realizado pelos músculos esquelético acima do nível de repouso. O exercício físico é planejado, estruturado e repetitivo¹³³ e proporciona diversos benefícios para a saúde e bem-estar da população, dentre estes: reduz o risco de doenças cardiovasculares¹³⁴, diminuição de tecido adiposo¹³⁵, melhora da função metabólica¹³⁶, melhora da força e fadiga muscular¹³⁷. Em nível encefálico há melhora da memória¹³⁸ e cognição¹³⁶. No sistema imunológico o exercício físico tem ação anti-inflamatória e modifica as respostas imunes¹³⁹. Diante disto, estudos clínicos recentes destacam o potencial do exercício físico nas alterações do SNC e SNP.

O exercício físico influencia diretamente nos mecanismos de defesa antioxidante do encéfalo, isto dependerá da intensidade e do tipo do exercício físico¹⁴⁰. O exercício de baixa intensidade já é suficiente para a biogênese mitocondrial e, sendo assim, melhora da capacidade oxidativa dos músculos esqueléticos¹⁴¹. O exercício moderado protege o encéfalo da ação oxidante¹⁴², atua na estimulação da neurogênese e a produção de fatores tróficos¹⁴³. O exercício físico de alta intensidade é considerado potencializador do estresse oxidativo¹⁴⁴, causam alterações metabólicas devido à limitação de energia induzida pela alta demanda de oxigênio durante atividades intensas¹⁴².

A fisioterapia aquática com suas diversas técnicas e a natação atuam no tratamento de diversas disfunções, visto que o ambiente aquático e seus princípios físicos favorecem o tratamento, facilitam as tarefas e terapias pertinentes para a melhora de cada indivíduo. Os princípios físicos como flutuação, imersão, resistência e temperatura atuam positivamente nas terapias²⁵. A imersão em água possui diversos efeitos cardiorrespiratórios que influenciarão na perfusão cerebrovascular,

aumento da pressão arterial média e débito cardíaco¹⁴⁵. A imersão em água fria induz melhora da recuperação funcional e desempenho muscular após o exercício físico²⁶, reduz os sinais clínicos da inflamação, como o edema e atenua a elevação da perfusão²⁷. Observou-se também os benefícios na imersão em água quente, como por exemplo, proporciona resistência no estresse inflamatório e oxidativo²⁸, além de combater a inflamação crônica e melhorar o metabolismo da glicose²⁹. A pressão hidrostática irá atuar na diminuição da frequência cardíaca, na qual, na postura prona irá influenciar positivamente nas alterações relacionadas a pressão arterial sistólica e diminuição da diastólica³⁰. Além disso, na água os pacientes se sentem mais seguros e confiantes, e conseqüentemente mais motivados, dado que devido as propriedades físicas da água há uma melhor estabilização e facilitação dos movimentos, simultaneamente aos estímulos proprioceptivos. Além disso, a temperatura da água geralmente aquecida favorece o relaxamento muscular, gerando analgesia²⁵.

Na revisão sistemática realizada por Gueita-Rodriguez e colaboradores (2019)¹⁴⁶, os autores analisaram e descreveram os efeitos da imersão em água no sistema nervoso em indivíduos saudáveis. Os efeitos da imersão em água na atividade cortical mostraram que há um aumento da atividade sensorial e motora, e que a excitabilidade cortical depende da intensidade dos estímulos realizados^{32,147}. Os efeitos neuroprotetores foram observados em um estudo que demonstrou aumento de BDNF na amostra sanguínea, benéfico para a saúde do cérebro. Os resultados foram melhores quando a terapia foi realizada na água em torno de 42°C, e não foi observado na temperatura de 35°C³³.

O estudo de Zivi e colaboradores (2018)³⁴ teve como objetivo comparar os efeitos do tratamento de pacientes com neuropatia periférica em ambiente aquático e no solo. Os pacientes foram submetidos a um programa de reabilitação hospitalar de quatro semanas com sessões diárias de um treino individual de fisioterapia tradicional (em ambiente terrestre), uma hora por dia, durante cinco dias por semana. Esse treinamento consistia em exercício em ciclo ergômetro, esteira, plataforma estabilométrica por uma hora por dia, durante seis dias por semana; e terapia ocupacional por uma hora por dia, durante cinco dias por semana. O tratamento em ambiente aquático foi realizado três dias por semana numa piscina aquecida a 32°C. Os exercícios realizados visavam o relaxamento, controle da respiração, equilíbrio, controle postural e exercícios de marcha. Estes exercícios aquáticos foram realizados substituindo a fisioterapia tradicional. Os autores constataram que os pacientes

tratados em ambiente aquático obtiveram melhora significativa na pontuação do índice de marcha dinâmica (do inglês, *Dynamic Gait Index*) que avalia o equilíbrio da marcha e o risco de quedas em comparação com o grupo tratado no solo. Porém, na escala de Categorias de Deambulação Funcional os pacientes tratados em solo obtiveram melhora significativa em comparação com os pacientes tratados em ambiente aquático. Os autores concluíram que os resultados foram semelhantes nas duas modalidades utilizadas, mas que a água pode proporcionar melhor efeito na percepção da dor, que foi mensurada pela escala de dor neuropática, e na confiança dos pacientes. Concluindo assim, que os benefícios da água, sua imersão e a temperatura foram o diferencial do tratamento realizado no estudo³⁴.

O estudo de Fernandes e colaboradores (2016)¹⁴⁸, avaliou o efeito da natação na dor, capacidade funcional, capacidade aeróbia e qualidade de vida em pacientes com fibromialgia. O protocolo foi realizado com natação livre, inicialmente com aquecimento de 5 minutos, seguidos de 40 minutos de exercício de natação e 5 minutos de resfriamento. As sessões compreenderam 50 minutos por dia e foram realizadas três vezes por semana durante 12 semanas. Após o tratamento através da natação, os indivíduos apresentaram redução da dor, principal sintoma da fibromialgia, além da melhora da qualidade de vida e da capacidade funcional¹⁴⁸. Diante do exposto, pode-se afirmar que a fisioterapia aquática, a natação e os princípios físicos da água são benéficos para o tratamento de pacientes com dor crônica.

A dor crônica, mais especificamente a dor neuropática é determinante para outras condições associadas, reduzindo a qualidade de vida e conseqüentemente acarretando num quadro depressivo para os portadores. Diante disto, Cruz (2019)¹⁴⁹, avaliou os efeitos de um programa de terapia aquática comparado a terapia realizada em solo na dor, depressão e na qualidade de vida de pessoas com doença de Parkinson. O grupo tratado com terapia aquática realizou 20 sessões, duas vezes por semana, durante 10 semanas. Cada sessão durou 45 minutos com temperatura da água de 30°C. As sessões foram iniciadas com aquecimento, seguidos de 30 minutos de prática de Ai Chi e por fim, com uma atividade de resfriamento. O grupo tratado com terapia no solo realizou o mesmo tempo de tratamento, com exercícios de aquecimento por 10 minutos, treinamento de força e exercícios aeróbios por 25 minutos, finalizado com 10 minutos de resfriamento. Os pacientes tratados com terapia aquática mostraram resultados significativamente melhores nas variáveis de

dor, humor, depressão e qualidade de vida após as sessões, comparados ao grupo de terapia no solo. Além disso, os resultados positivos permaneceram até um mês após a finalização do tratamento¹⁴⁹.

Além disso, dois outros estudos avaliaram o efeito da natação em indivíduos com dor neuropática^{127,150}. Ortega e colaboradores (2009)¹⁵⁰ investigaram o efeito da fisioterapia aquática em pacientes com fibromialgia, uma doença que é caracterizada por dor crônica generalizada e alodinia. Foram separados dois grupos, um grupo com 14 indivíduos portadores de fibromialgia e 13 indivíduos saudáveis. As sessões de tratamento foram compreendidas em 60 minutos, três vezes por semana, por quatro meses em uma piscina aquecida com temperatura de $32\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os exercícios realizados foram alongamento, aquecimento, exercícios de fortalecimento e relaxamento. Como conclusão do estudo, o grupo de pacientes com fibromialgia obtiveram redução significativa dos níveis de interleucina-8 (IL-8), proteína C-reativa e IFN- γ , redução do cortisol e aumento de noradrenalina, além de melhora da qualidade de vida¹⁵⁰.

O estudo de Salm e colaboradores (2019)¹²⁷ analisou em 28 indivíduos os efeitos do tratamento de fisioterapia aquática na fibromialgia. Todos os pacientes receberam o tratamento em piscina com água aquecida em $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ e as sessões duraram de 18 a 50 minutos, três vezes por semana, por seis semanas. Os exercícios realizados na piscina foram alongamentos e fortalecimento dos principais grupos musculares. Após as seis semanas de tratamento foram mensuradas as concentrações séricas de IL-6, IL-10 e TNF e, os autores puderam constatar que houve redução dos níveis de IL-6 quando comparadas as mensurações prévias ao protocolo experimental¹²⁷.

Estes estudos clínicos demonstram que os princípios físicos da água favorecem os tratamentos e conseqüentemente atuam no bem-estar, confiança e socialização dos pacientes, motivando-os e atuando de forma positiva e melhorando a qualidade de vida e a dor. Diante disto, é totalmente aceitável considerar a fisioterapia aquática e a natação como estratégia complementar para o manejo da dor crônica de acordo com os sintomas e necessidades dos pacientes³⁴.

1.1.4 Efeitos do exercício físico de natação em modelos animais

A literatura científica destaca diversos benefícios do exercício de natação em processos patológicos em modelos animais, e seus efeitos neurobiológicos serão destacados a seguir. Um protocolo de natação que consistiu de 30 minutos por dia, cinco vezes por semana, com duração de seis semanas, demonstrou uma aceleração do processo de extinção de memória aversiva, confirmando o efeito ansiolítico da natação, com potencial implicação para transtornos de ansiedade¹⁵¹. Outro estudo observou que a natação melhorou a qualidade óssea e a força em ratos osteopênicos, além de ser eficaz na prevenção dos efeitos deletérios da osteoporose¹⁵². Ao nível inflamatório, verificou-se que a natação inibiu a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em ratos machos e elevou a os níveis de IL-10, submetidos a um tratamento com duração de aproximadamente uma hora e meia de natação, cinco vezes por semana, durante sete semanas em um modelo de colite crônica¹⁵³. Dessa maneira, destacamos a eficácia da natação observadas desde modelos animais de doenças ortopédicas até modelos de doenças do SNC.

Além dos efeitos relatados anteriormente, diversos estudos destacaram os efeitos do exercício físico de natação em modelos animais de dor neuropática. O estudo experimental pré-clínico de Tian e colaboradores (2017)¹⁵⁴ demonstrou que um protocolo de cinco semanas de natação foi eficaz para redução da alodinia mecânica no neuroma da pata de ratos machos Sprague-Dawley. Além disso, o exercício atenuou o aumento de NGF e BDNF provocados pela lesão, com efeitos que permaneceram por pelo menos uma semana após o término dos exercícios¹⁵⁴.

Um artigo do nosso grupo de pesquisa¹⁵⁵ investigou o efeito do exercício de natação de alta intensidade na dor neuropática em camundongos Swiss machos submetidos ao modelo de síndrome da dor regional complexa do tipo I. Este estudo demonstrou que o exercício de natação de alta intensidade reduziu a alodinia mecânica, e que os sistemas adenosinérgico e opioidérgico contribuem para esse efeito analgésico. Chen e colaboradores (2012)¹⁵⁶ constataram que os animais submetidos a natação por 21 dias apresentaram redução da expressão de TNF e IL-1 β no nervo isquiático quando comparados aos animais não exercitados. Essa redução está associada a atenuação da dor neuropática após lesão por constrição crônica do nervo isquiático.

Por outro lado, existe certa controvérsia com relação ao efeito protetor do exercício na dor neuropática periférica. O estudo de Bertolini e colaboradores (2011)¹⁵⁷ demonstrou aumento significativo da nocicepção induzida pela natação

aplicada previamente à ligadura do nervo isquiático, em ratos Wistar. Porém, o estudo possui diversas limitações, como a falta de avaliação dos mecanismos. Diversos estudos que investigaram o efeito da natação na dor neuropática periférica em modelos animais estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito analgésico do exercício físico de natação em modelos animais de dor neuropática.

Continuação

Referência	Modelo de Dor	Animais	Tipo de Exercício	Exercício antes da lesão	Início do exercício pós-lesão	Duração do Exercício + Intensidade	Eficaz para a Dor?
Farzad et al. (2018) ¹⁵⁸	Neuropática - constrição crônica do nervo isquiático	Ratos machos	Natação	Três sessões com duração de 10 e 20 min	3 dias após a lesão	60 min, 5 dias na semana por 4 semanas (temperatura entre 34 e 37°C)	Sim, redução da hiperalgesia mecânica e térmica, alodinia tátil e fria.
Chen et al. (2012) ¹⁵⁶	Neuropática - constrição crônica do nervo isquiático	Ratos machos	Natação	Duas sessões de 90 min	1 dia após a lesão	90 min, por 6 semanas (temperatura 37°C)	Sim, redução da hiperalgesia térmica e alodinia mecânica.
Shen et al. (2013) ¹⁵⁹	Neuropática - constrição crônica do nervo isquiático	Ratos machos	Natação	60 min por 2 semanas	5 dias após a lesão	60 min, 5 dias na semana, por 4 semanas (temperatura 34°C)	Sim, redução da alodinia mecânica e hiperalgesia térmica.
Aghdam et al. (2018) ¹⁶⁰	Neuropática - diabetes induzido por dieta rica em gordura	Ratos machos	Natação	Não aplicado	4 semanas após início da dieta rica em gordura	60 min, 5 dias na semana por 10 semanas (temperatura 34 a 36°C)	Sim, redução da hiperalgesia térmica.
Sun et al. (2019) ¹⁶¹	Neuropática - transposição do neuroma tibial	Ratos machos	Natação	Não aplicado	7 dias após a lesão	60 min, 5 dias na semana por 5 semanas (temperatura 34 a 36°C)	Sim, analgesia.
Tian et al. (2018) ¹⁵⁴	Neuropática - transposição do neuroma tibial	Ratos machos	Natação	Cinco sessões de 10 a 60 min	7 dias após a lesão	60 min, 5 dias na semana por 4 semanas (temperatura 30°C)	Sim, redução da alodinia.
Kuphal et al. (2007) ¹⁶²	Neuropática - ligadura parcial do nervo isquiático	Camundongos machos	Natação	30 minutos por 5 dias	1 dia após a lesão	30 min, por 6 dias (temperatura 37°C)	Sim, redução da hiperalgesia térmica
Martins et al. (2013) ¹⁵⁵	Neuropática – síndrome de dor regional complexa tipo I	Camundongos machos	Natação	Não aplicado	5 dias após a lesão	30 min, 7 dias de tratamento (temperatura 37°C)	Sim, redução da alodinia.

Conclusão

Bertolini et al. (2011) ¹⁵⁷	Neuropática - lesão de constrição crônica do nervo isquiático	Ratos machos	Natação	6 semanas	Não aplicado	10 a 60 min, 3 dias na semana, por 6 semanas (temperatura 30 a 32°C)	Não, maior hiperalgesia.
Rossi et al. (2011) ¹⁶³	Neuropática - diabetes induzido por injeção intraperitoneal	Ratos fêmeas	Natação	Não aplicado	Não descrito	10-60 min, 5 dias por semana, por 8 semanas (temperatura 27°C)	Sim, para hiperalgesia térmica.
Hutchinson et al. (2004) ¹⁶⁴	Lesão medula espinal	Ratos fêmeas	Natação	Não aplicado	4 dias após a lesão	20-25 min por dia, 5 dias na semana, por 7 semanas (temperatura 35°C)	Sim, para alodinia, efeito benéfico transitório, retornou em 7 semanas.
Almeida et al. (2015) ¹⁶⁵	Neuropática - lesão de constrição crônica do nervo isquiático	Camundongos machos	Natação	Não aplicado	7 dias após a lesão	10-50min por dia, 5 dias na semana, por 5 semanas (temperatura 28°C)	Sim, para hiperalgesia mecânica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da natação sobre as interações neuroimunes e neuroinflamação no CPF e suas consequências na dor neuropática após a lesão nervosa periférica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a concentração de lactato sanguíneo e determinar a intensidade do protocolo de natação utilizado.

Avaliar o efeito da natação sobre os componentes sensorial, emocional e cognitivo da dor neuropática após a lesão nervosa periférica.

Avaliar o efeito da natação sobre as concentrações de IL-4, IL-6 e IL-10 e BDNF no CPF após a lesão nervosa periférica.

Avaliar o efeito da natação sobre a imunomarcagem de células gliais (micróglia e astrócitos) no CPF após a lesão nervosa periférica.

Avaliar o efeito da natação sobre a imunomarcagem da micróglia M1 e micróglia M2 no CPF após a lesão nervosa periférica.

3 MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa é caracterizada como um estudo quantitativo experimental não-clínico. Este estudo foi escrito de acordo com as diretrizes do guia de reporte de estudos pré-clínicos denominado ARRIVE¹⁶⁶ (do inglês, *Animals in Research: Reporting in vivo Experiments*).

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos utilizados estão listados a seguir, com seus respectivos fabricantes e locais de origem. Isoflurano (Isoforine®, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Balança de alta precisão (Shimadzu Corporation, Japão). Monofilamento de von Frey 0,6 g (VFH, Stoelting, IL, EUA). Caixa de acrílico com dimensões de 9 x 7 x 11 cm, com tampa e tela de arame com malha de 6 mm (70 x 40 cm) (Alumecril, São José, SC, Brasil). Para os Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) será utilizado: Tween® 20, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), aprotinina, cloreto de benzetônio e albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Kits de ELISA DuoSet para camundongos (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA): IL-4 (DY404), IL-6 (DY406), IL-10 (DY417) e BDNF (DY248). Leitor de placas (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China). Para o Western Blotting será utilizado: Tampão de lise RIPA, Ortovanadato de sódio, PMSF, Coquetel de inibidores de proteases e tampão Laemmli (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), membrana de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), anticorpo monoclonal Rabbit anti-Iba-1 (Abcam, Cambridge, UK), anticorpo monoclonal Rabbit anti-GFAP (Abcam, Cambridge, UK), anticorpo monoclonal Rabbit anti-NOS2 (ou anti-iNOS) (NBP1-33780, Novus Biologicals, Centennial, CO, EUA), anticorpo monoclonal Rabbit anti-Arginase-1 (93668S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), anticorpo policlonal Goat IgG anti-mouse MMR/CD206 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) Rabbit anti- β -actina-HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), anticorpo anti-CD86

(BU63, ab213044, Abcam, Cambridge, UK), kit de quimioluminescência (ECL; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA), fotodocumentador e software de aquisição das imagens (iBright Imaging Systems, iBright Analysis Software, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para as análises estatísticas será utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Arena de madeira com 40 x 40 x 30 cm. Software ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA).

3.3 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos usando camundongos Swiss machos (35 a 50 g). Inicialmente foram mantidos 10 animais por caixa de forma randomizada, os quais permaneceram em ambientes aclimatados a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, no ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 6h:00min), com acesso a ração e água a vontade. Os animais foram distribuídos entre os grupos amostrais de forma randomizada. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes¹⁶⁷. O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram o mínimo necessário para demonstrar o consistente efeito do tratamento testado.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO E CÁLCULO DA AMOSTRA

A definição do tamanho amostral foi realizada através do cálculo estatístico baseado na equação que determinará a quantidade de animais de um grupo em uma amostra sem reposição¹⁶⁸. Utilizando a seguinte fórmula: $n = (((z \text{ alfa} + z \text{ beta}) * s) / \text{sigma})^2$. O valor de alfa foi fixado em 0,05 e o valor de z alfa foi 1,96. O valor de beta foi determinado em 0,10 e o valor de z beta de 1,28. Foi estabelecido o mínimo de 40% como valor de diferença entre as médias dos grupos (sigma), baseado em dados experimentais anteriores do nosso grupo e estabelecido o valor do desvio padrão em 35% do valor das médias (s). Com os valores da fórmula aplicado teremos: $n = (((1,96 + 1,28) * 35) / 40)^2 = 8$. Considerando possíveis perdas no N amostral devido ao procedimento cirúrgico e ao tratamento com natação acrescentamos 25 % ($n=2$) ao N amostral, totalizando 10 animais por grupo.

O desenho do estudo conteve quatro grupos experimentais: Sham/Não exercitado (n=10); Sham/Natação (n=10); Lesão/Não exercitado (n=10); Lesão/Natação (n=10). Inicialmente os grupos começaram com 10 animais cada, os grupos Sham/Não exercitado e Lesão/Exercitado tiveram uma perda amostral (n=01) em cada grupo, devido a morte do animal no procedimento cirúrgico e na natação respectivamente. O protocolo experimental está demonstrado na figura 3.

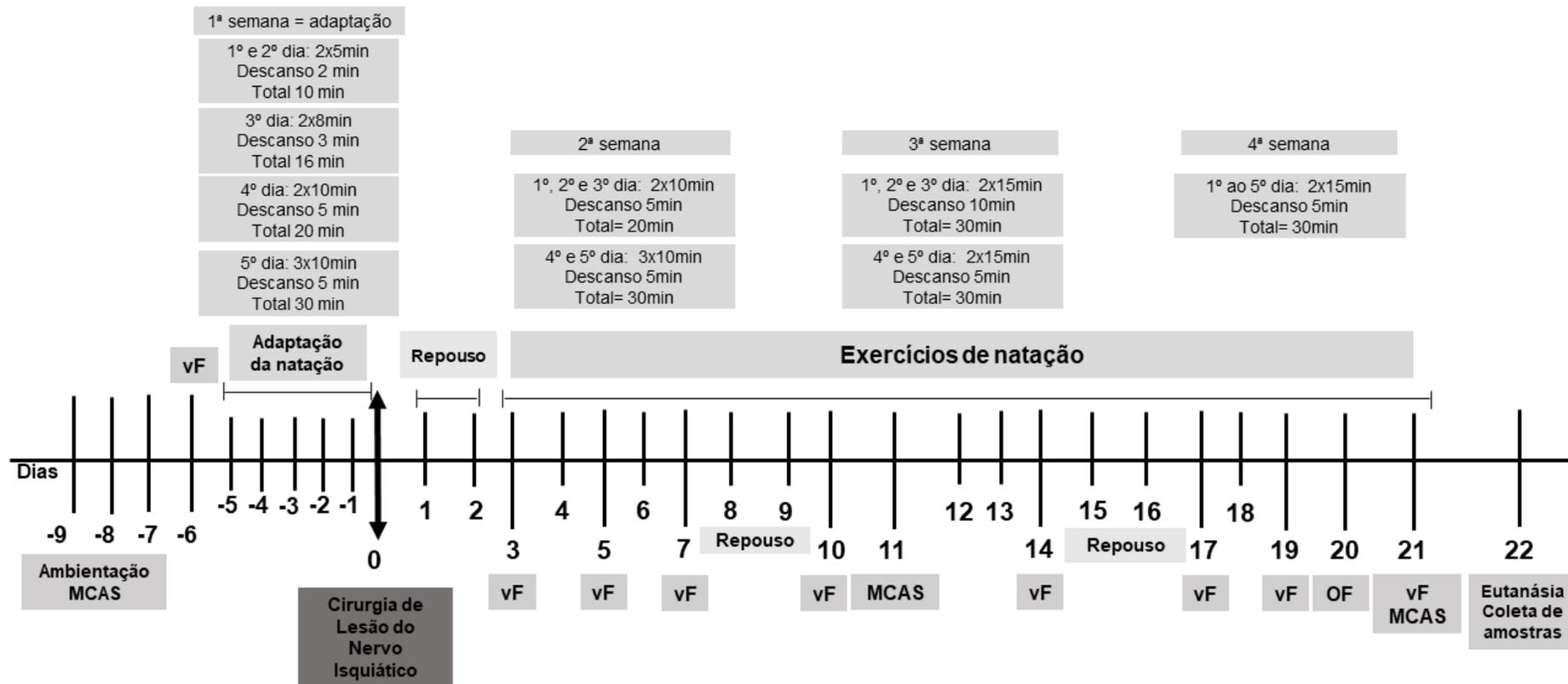


Figura 3. Desenho do estudo.

Os animais foram adaptados ao protocolo de exercício físico e posteriormente foram submetidos ao procedimento cirúrgico de lesão do nervo isquiático. Três dias após a lesão foi iniciado o protocolo de natação, realizado por três semanas, nas quais dentro desse período foi realizado os seguintes testes: avaliação do componente sensorial da dor neuropática, na qual foi utilizado teste de von Frey. A dor espontânea e o componente emocional foram avaliados pelo teste de campo aberto e o componente cognitivo foi avaliado pelo teste de esquiva ao estímulo mecânico. Após o protocolo de natação, no vigésimo segundo dia após a lesão os animais foram eutanasiados e foi coletada amostras do córtex pré-frontal para as análises bioquímicas. MCAS, do inglês, *Mechanical Conflict-Avoidance System*; VF, von Frey; OF, do inglês, *open field*.

3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

3.5.1 Indução da lesão por esmagamento do nervo isquiático

Os animais foram previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal contendo xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/Kg)⁷⁰. Após a verificação do estado de consciência do animal (através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), efetuou-se a tricotomia da área a ser operada. Em seguida, foi realizada uma incisão curvilínea na coxa direita do animal, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminando próximo à fossa poplítea, ao nível da inserção dos músculos isquiotibiais. A exposição do nervo isquiático foi conseguida após a divulsão dos músculos semitendíneo e reto femoral. Com o auxílio de uma pinça hemostática não serrilhada, foi realizado o esmagamento do nervo isquiático direito por 30 s, apertando até o primeiro estágio da gramalheira da pinça, aproximadamente 10 mm acima da trifurcação do nervo⁶³. Logo após, a pele foi reparada com dois pontos de sutura com fio absorvível (Ethicon, 4-0) e realizada a assepsia no local com antisséptico (Povidine®). Após a cirurgia, os animais permaneceram próximos a uma fonte de calor até retornarem a deambular pela caixa, voltando então ao biotério do laboratório. A cirurgia nos animais do grupo Sham contou com os mesmos procedimentos até a exposição do nervo isquiático, porém sem a realização do esmagamento.

3.5.2 Protocolo de exercício físico de natação

Os animais foram colocados em uma caixa plástica dividida em oito compartimentos (170 x 100 mm), preenchida com 35L de água a 35°C. Foi usado um termostato para manter a temperatura da água e um termômetro preso ao compartimento para indicar a temperatura em tempo real¹⁷⁰. Foi adicionado sabão líquido (8 mL) para reduzir a tensão superficial e abolir o comportamento de 'flutuar'. A natação foi supervisionada continuamente. Os animais nadaram em grupo de quatro a oito camundongos, porque foi demonstrado que a intensidade do exercício de natação foi significativamente aumentada pela interação entre os animais¹⁷⁰. Após cada sessão de exercício, os animais foram secos suavemente com uma toalha de pano¹⁷¹.

O programa de natação foi adaptado de Almeida et al (2015)¹⁶⁵ e consistiu em duas fases: adaptação (5 dias antes da lesão do nervo) e treinamento (3 semanas, após a lesão do nervo). Durante a fase de adaptação, os camundongos foram submetidos a exercício de natação 2 séries de 5 minutos no primeiro e segundo dia com descanso de 2 minutos, totalizando 10 minutos de natação. No terceiro dia os animais nadaram 2 séries de 8 minutos com descanso de 3 minutos, totalizando 16 minutos de exercício, no quarto dia os animais nadaram 2 séries de 10 minutos com descanso de 5 minutos, com total de 20 minutos de natação e no quinto dia nadaram 3 séries de 10 minutos, totalizando 30 minutos e com descanso de 5 minutos. A adaptação teve como objetivo reduzir o estresse induzido pela água sem promover alterações fisiológicas em relação ao treinamento físico. Esse período de adaptação foi realizado antes do procedimento de lesão do nervo¹⁷¹.

O período de treinamento iniciou 3 dias após a lesão do nervo. No terceiro, quarto e quinto dias pós-operatório os animais nadaram 2 séries de 10 minutos com descanso de 5 minutos, totalizando 20 minutos de natação. No sexto e sétimo dia pós-operatório nadaram 3 séries de 10 minutos, descansando 5 minutos entre as séries, totalizando 30 minutos. No oitavo e nono dia os animais permaneceram em repouso. Do décimo ao décimo segundo dia os animais nadaram 15 minutos, descansaram 10 minutos e nadaram mais 15 minutos. No décimo terceiro e décimo quarto dia nadaram 2 séries de 15 minutos com descanso de 5 minutos entre as séries. No décimo quinto e décimo sexto dia os animais permaneceram em repouso. Do décimo sétimo até o vigésimo primeiro dia pós-operatório os animais nadaram 2 séries de 15 minutos com descanso de 5 minutos entre elas, totalizando 30 minutos. O exercício foi realizado no mesmo horário todos os dias (entre 9:00 h e 11:00 h). Os animais dos grupos não exercitados foram expostos ao ambiente aquático (água rasa à 3 cm de profundidade) nas mesmas condições de tempo dos animais treinados, esses camundongos ficaram somente com o corpo submerso, sem precisar nadar, adaptado de Liu et al (2017)¹⁷⁰.

3.5.3 Mensuração do lactato sanguíneo

Para estabelecer a intensidade do treinamento, foi realizado o teste para mensuração do estado estável máximo de lactato sanguíneo (do inglês, *maximal lactate steady state*, MLSS)⁷⁰. Os animais foram submetidos ao protocolo de

natação já estabelecido (item 3.5.2), nos quais foram obtidas amostras de sangue para posterior aferição da concentração de lactato.

Os testes foram realizados antes da natação para aferição da concentração basal de lactato sanguíneo, no final da primeira semana de adaptação (pré-cirurgia) e nos dias 7, 14 e 21 após lesão nervosa periférica. O critério para considerar a intensidade da MLSS foi uma variação da concentração de lactato não superior a 1 mmol/L entre os 10 e 30 min de natação^{172,173}.

Após a realização da higienização com álcool 70%, a porção distal da cauda do animal foi cortada, e 25 µl de sangue foram coletados em microcapilares heparinizados. As amostras foram depositadas em microtubos de 1,5 ml que continham 50 µl de fluoreto de sódio a 1%, após a coleta as amostras foram armazenadas em um freezer -20°C até as análises. As concentrações de lactato foram determinadas usando um analisador de lactato (YSI Modelo 2700 SPORT; YSI, Yellow Springs, OH, EUA). Antes de cada teste, o equipamento foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante⁷⁰.

3.5.4 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A frequência de resposta (expressa em porcentagem) frente a um estímulo mecânico foi avaliada utilizando o monofilamento de von Frey (0,6 g) (VFH, Stoelting, Chicago, USA). O teste consistiu na aplicação do filamento na pata, com a duração de 5 s, por 10 vezes. Para as avaliações, foi utilizado uma plataforma (70 x 40 cm) que continha uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior direita, os animais foram colocados individualmente em caixa de acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberto com tampa, posicionada sobre a plataforma. O filamento foi aplicado atendendo a alguns critérios como: (1) a aplicação foi feita perpendicularmente à superfície plantar; (2) a pressão foi suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; (3) os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; e (4) a resposta de retirada da pata foi considerada quando o animal remover totalmente a pata estimulada (direita) da tela de apoio.

3.5.5 Teste do campo aberto

Para verificar a função locomotora espontânea dos animais, e relacioná-la componente emocional da dor, foi realizado o teste do campo aberto. O aparato consiste em uma arena quadrada de madeira com 40 x 40 x 40 cm de dimensões. Os animais foram colocados individualmente no centro do aparato, permitindo que explorassem livremente por um período de 5 min. O comportamento exploratório do animal foi filmado e foi avaliada a distância total de locomoção percorrida (em metros), número de entradas no centro e o tempo permanecido dentro do centro do aparato (em s) utilizando-se o software ANYmaze® (Stoelting, USA). O aparato foi limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes, a fim de evitar indícios de odor animal⁶².

3.5.6 Teste de esquiva ao estímulo mecânico

O teste de esquiva ao estímulo mecânico (do inglês, *Mechanical Conflict-Avoidance System* - MCAS) avaliou a capacidade cognitiva relacionada à dor no modelo de esmagamento do nervo isquiático. O teste foi realizado em um aparato que apresentava três câmaras de acrílico vermelho transparente. A câmara 1 de 12,5 cm³, é iluminada com diodo emissor de luz (LED), servindo como um estímulo levemente aversivo, a fim de incentivar a "fuga" do animal para as câmaras escuras. Essa câmara com luz de LED é separada do restante da unidade por uma barreira móvel. A câmara 2 é a câmara de teste com 27 cm de comprimento que liga as câmaras 1 e 3. A câmara 3 também com 12,5 cm³ é escura e fica na extremidade oposta à câmara 1. O piso da câmara 2 do aparato é composto por sondas de aço de ~ 0,5 mm de diâmetro e 5 mm de altura, as quais promoveram um estímulo mecânico nas patas dos animais. Para o teste, os animais foram colocados na câmara 1 com a barreira fechada. O LED foi aceso após 15 s e a barreira será removida 20 s depois. O tempo que os animais levaram para sair da câmara 1 e cruzar o ponto médio da câmara 2 foi usado como medida de resultado experimental¹⁷⁴.

3.5.7 Ensaios bioquímicos

Aproximadamente 24 horas após a última avaliação comportamental, no 22º após a lesão do nervo isquiático os camundongos foram anestesiados (1-2% de isoflurano a 100% de oxigênio) e eutanasiados por decapitação, para a retirada do CPF para a realização dos ensaios bioquímicos de ELISA e Western Blotting. Após a

dissecação as amostras foram imediatamente estocadas em freezer -80°C até a realização das análises.

3.5.7.1 Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima

Para a avaliação dos níveis de citocinas e do BDNF foi utilizada a metodologia previamente descrita por Bobinski e colaboradores (2011)⁷⁰. As amostras foram homogeneizadas com a utilização de um pistilo em tampão salina fosfato, contendo: Tween 20 (0,05%), cloreto de benzetônio (0,1 mM), EDTA (10 mM), NaCl (0,4 mM), aprotinina A (2 µg/ml), PMSF (0,1 mM) e albumina sérica bovina (BSA) (0,5%). Posteriormente os homogenatos foram centrifugados a 3000 ×g, por 10 min, a 4°C para a retirada do sobrenadante, que foi utilizado para o ensaio. Os níveis de IL-4, IL-6, IL-10 e BDNF foram analisados por meio de kits de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) para camundongos de acordo com as recomendações do fabricante. O conteúdo proteico total foi mensurado do sobrenadante pelo método de Bradford¹⁷⁵. A absorbância, após o ensaio, foi mensurada utilizando-se um leitor de placas em 450 e 550 nm e os valores foram expressos como pg de citocina/mg de proteína.

3.5.7.2 Western Blotting

O ensaio de Western Blotting foi utilizado para a quantificação do imunoc conteúdo de Iba-1 (marcador de micróglia) e GFAP (marcador de astrócitos), além de imunomarcadores da micróglia M1 (CD86 e NOS2) e M2 (Arg-1, CD206). As amostras foram homogeneizadas e incubadas em tampão de lise RIPA com coquetel de inibidores de proteases 1%, centrifugadas à 6000 ×g por 20 minutos (4°C) e o sobrenadante foi recolhido, separado e armazenado em freezer -80°C. O conteúdo proteico foi mensurado pelo método de Bradford¹⁷⁵. Alíquotas de proteína total (50 µg) foram fervidas a 95°C por 5 minutos em 25% do volume em tampão Laemmli. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, que foi bloqueada e incubada (4°C) com os anticorpos primários anti: Iba-1, GFAP, CD86, NOS2, Arg-1, CD206 ou β-actina-HRP, como controle. Depois de lavadas as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado, conjugado à

peroxidase em temperatura ambiente por uma hora. Após esse período, foi realizada a exposição das membranas ao kit de quimiluminescência e revelação através de um fotodocumentador (iBright Imaging Systems, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa do próprio fotodocumentador (iBright Analysis Software, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a β -actina e expressos graficamente como unidades arbitrárias.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo.

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Modelo animal de lesão nervosa periférica	Independente	Qualitativa nominal	Sim/Não (Induzido o modelo ou não induzido)
Tratamento com Exercício físico de natação	Independente	Qualitativa nominal	Sim/Não (Tratado ou não tratado)
Hiperalgisia Mecânica	Dependente	Quantitativa discreta	Média e desvio padrão (frequência de resposta em %)
Locomoção espontânea, número de entradas no centro e tempo de permanência dentro do centro	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão (distância total percorrida em metros)
Avaliação cognitiva da nocicepção	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão (tempo em segundos)
Concentração de biomarcadores (IL-4, IL-6, IL-10) e BDNF	Dependente	Quantitativo contínuo	Média e desvio padrão (pg de citocina/mg de proteína)
Imunomarcção de micróglia e astrócitos e fenótipo de micróglia M1 e M2	Dependente	Quantitativo contínuo	Média e desvio padrão (unidades arbitrárias)

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados no programa *Graph Pad Prism* na versão 8.0 (*La Jolla*, Califórnia, EUA). Foi avaliado a distribuição normal dos dados por meio do teste de *Shapiro–Wilk* e considerados paramétricos. Desta forma, os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os dados paramétricos foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de duas vias, com medida repetida para as análises do decurso temporal do teste de von Frey, seguido pelo teste de *post-hoc* de *Tukey*. Em todas as análises, valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi aprovado pelo CEUA da UNISUL sob o protocolo de número 21.007.4.01.IV. Os experimentos foram realizados conforme o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes¹⁶⁷, e estavam de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) descritos na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos (DBCA)¹⁷⁶. O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foi o mínimo necessário para demonstrar o efeito do tratamento com natação. A indução da morte indolor assistida (MIA) foi realizada sob a supervisão de médico veterinário responsável de acordo com a resolução 1000, 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária. Os animais foram anestesiados com isoflurano (2-3% a 100% de oxigênio) e eutanasiados por decapitação para retirada das amostras de tecido, que foram devidamente processados para a realização dos ensaios bioquímicos.

4 ARTIGO

Natação de alta intensidade melhora os aspectos sensoriais, cognitivos e emocionais da dor neuropática e promove imunorregulação no córtex pré-frontal de camundongos com lesão nervosa periférica

Francielly Suzaine da Silva¹, Heloiza dos Santos Baldança^{1,2}, Josiel Mileno Mack^{1,3,4}, Fernanda Belle¹, Guilherme de Azevedo Traebert⁴, Verônica Vargas Horewicz¹, Luiz Guilherme Antonacci Guglielmo⁵, Daniel Fernandes Martins¹ and Franciane Bobinski^{1*}

¹ Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Brazil

² Faculty of Physical Therapy, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Brazil.

³Department of Medical Clinic, Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

⁴ Faculty of Medicine, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Brazil.

⁵ Sports Center, Federal University of Santa Catarina, Physical Effort Laboratory, Florianópolis, Brazil.

* **Correspondence:** Franciane Bobinski, franciane.bobinski@animaeducacao.com.br

Keywords: Natação, Exercício físico, Dor neuropática, Córtex pré-frontal, Células gliais, Citocinas.

Resumo

Introdução: A dor neuropática é consequência de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial. Além da redução da qualidade de vida e saúde física, a dor neuropática leva a comorbidades emocionais como depressão e ansiedade. A natação já se mostrou capaz de reduzir a dor neuropática, além de restaurar a função motora e nervosa após lesões neuronais, no entanto, os mecanismos neuroimunes supraespinais ainda não estão totalmente estabelecidos.

Objetivo: Compreender o efeito da natação nos componentes sensorial, afetivo e cognitivo da dor neuropática, e compreender o mecanismo de ação dessa terapia sobre as interações neuroimunes no córtex pré-frontal (CPF) após a lesão nervosa periférica.

Métodos: Esse trabalho pré-clínico (CEUA 21.007.4.01.IV) utilizou camundongos Swiss machos divididos em 4 grupos: Sham/Não exercitado (n=9); Sham/Natação (n=10); Lesão/Não exercitado (n=10) e Lesão/Natação (n=9), que passaram por cirurgia de esmagamento do nervo isquiático/ou cirurgia sham e que foram submetidos a um protocolo de natação de 4 semanas, iniciado no 3º dia após a lesão. A intensidade do protocolo de natação foi definido pela concentração de lactato sanguíneo e definição da máxima fase estável do lactato. Para a avaliação do componente sensorial da dor neuropática foi utilizado teste de von Frey. A dor espontânea e o componente emocional foram avaliados pelo teste de campo aberto e o componente cognitivo foi avaliado pelo teste de esquiva ao estímulo mecânico. No 22ª após a lesão, os animais foram eutanasiados e amostras do CPF foram retiradas para análise. O Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA) foi utilizado para mensuração da interleucina (IL)-4, IL-6 e IL-10 e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Por ensaio de Western Blotting foi mensurado o imunoconteúdo de Iba-1 (marcador de micróglia) e GFAP (marcador de astrócitos), além de imunomarcadores de fenótipo da micróglia M1 (CD86 e NOS2) e M2 (Arg-1, CD206).

Resultados: A lesão do nervo isquiático induziu hiperalgesia mecânica e alterou os comportamentos relacionados a cognição e ansiedade. A natação de alta intensidade nos animais que tiveram o nervo lesionado reduziu a hiperalgesia mecânica, a latência de escape do estímulo luminoso aversivo, e promoveu aumento da exploração do centro do campo aberto. Além de reduzir a concentração de IL-6, IL-4, IL-10 e BDNF no CPF, 22 dias após lesão nervosa.

Conclusão: Os resultados mostraram que a natação produziu analgesia, melhorando os comportamentos envolvidos com os aspectos sensório-discriminativo, afetivo-motivacional e avaliativo-cognitivo da dor neuropática, além de promover efeito imunorregulatório no CPF.

Palavras-chave: Natação, Exercício físico, Dor neuropática, Córtex pré-frontal, Células gliais, Citocinas.

Abstract

Introduction: Neuropathic pain is a consequence of an injury or disease that affects the somatosensory system. In addition to reduced quality of life and physical health, neuropathic pain leads to emotional comorbidities such as depression and anxiety. Swimming has already been shown to be able to reduce neuropathic pain, in addition to restoring motor and nerve function after neuronal injuries, however, supraspinal neuroimmune mechanisms are not yet fully established.

Objective: To understand the effect of swimming on the sensory, affective and cognitive components of neuropathic pain, and to understand the mechanism of action of this therapy on neuroimmune interactions in the prefrontal cortex (PFC) after peripheral nerve injury.

Methods: This preclinical work (CEUA 21.007.4.01.IV) used male Swiss mice divided into 4 groups: Sham/Non exercised (n=9); Sham/Exercised (n=10); PNI/Non exercised (n=10) and PNI/Exercised (n=9), who underwent sciatic nerve crush surgery/or sham surgery and who underwent a 4-week swimming protocol, starting on the 3rd day after the injury. The intensity of the swimming protocol was defined by the blood lactate concentration and definition of the maximum lactate stable phase. To assess the sensory component of neuropathic pain, the von Frey test was used. Spontaneous pain and the emotional component were assessed by the open field test and the cognitive component was assessed by the mechanical stimulus avoidance test. On the 22nd day after injury, the animals were euthanized and CPF samples were taken for analysis. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to measure interleukin (IL)-4, IL-6 and IL-10 and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). By Western Blotting assay, the immunocontent of Iba-1 (microglia marker) and GFAP (astrocyte marker) was measured, as well as immunomarkers of microglial phenotype M1 (CD86 and NOS2) and M2 (Arg-1, CD206).

Results: Sciatic nerve injury induced mechanical hyperalgesia and altered behaviors related to cognition and anxiety. High-intensity swimming in the animals that had the nerve injured reduced mechanical hyperalgesia, the escape latency of the aversive light stimulus, and promoted increased exploration of the center of the open field. In

addition to reducing the concentration of IL-6, IL-4, IL-10 and BDNF in CPF, 22 days after nerve injury.

Conclusion: The results showed that swimming produced analgesia, improving the behaviors involved with the sensory-discriminative, affective-motivational and evaluative-cognitive aspects of neuropathic pain, in addition to promoting an immunoregulatory effect on PFC.

Keywords: Swimming, Physical exercise, Neuropathic pain, Prefrontal cortex, Glial cells, Cytokines.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo demonstrou que o esmagamento do nervo isquiático produziu hiperalgesia mecânica e alteração dos comportamentos relacionados a cognição e ansiedade, que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da dor neuropática. Ainda, apesar da neuroinflamação não estar bem definida, ocorreu redução de IL-6 e IL-4 no CPF, ao 22º dia após a lesão.

Nosso protocolo de exercício foi determinado como natação de alta intensidade. Esse protocolo demonstrou que a natação realizada do 3º ao 21º após a LNP produz analgesia, melhorando os comportamentos envolvidos com os aspectos sensório-discriminativo, afetivo-motivacional e avaliativo-cognitivo da dor neuropática, além de promover efeito imunorregulatório no CPF, reduzindo os níveis de IL-6, IL-4, IL-10 e BDNF, o que pode explicar, em parte, o mecanismo analgésico da natação. Nossos resultados podem auxiliar no delineamento estudos pré-clínicos futuros para melhorar a compreensão dos mecanismos da natação sobre e as interações neuroimunes nas estruturas supraespinais, como o CPF e regiões adjacentes e assim melhorar a compreensão dos efeitos analgésicos da natação, fornecendo base para sua utilização clínica como terapia complementar no tratamento de LNP.

Este estudo deixa algumas lacunas como a ausência da investigação dos mediadores inflamatórios e marcadores de células gliais e dos fenótipos M1 e M2 da micróglia ao longo do decurso temporal da dor neuropática, assim, poderíamos observar mais claramente os diferentes padrões de ativação funcional da micróglia e dos mediadores inflamatórios liberados. Ainda, o modelo de esmagamento do nervo isquiático, apesar de desenvolver dor neuropática, é autolimitado pelo processo de regeneração que se inicia logo após a lesão, o que provavelmente nos impediu de observar um efeito mais robusto da neuroinflamação ao 22º dia após o esmagamento. Outra limitação foi a falta de investigação em camundongos fêmeas pois sabemos que funções fisiológicas e patológicas são influenciadas pelo sexo e importantes diferenças podem existir na reprodução dos tratamentos em humanos, e ainda no contexto clínico da dor neuropática há mais casos entre indivíduos do sexo feminino.

REFERÊNCIAS

1. Sommer C, Leinders M, Üçeyler N. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain. *Pain* 2017;159(3):595–602.
2. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Prim* 2017;3:1–20.
3. International Association for the Study of Pain. IASP Terminology. Washington 2017.
4. Posso I, Palmeira C, Vieira E. Epidemiologia da dor neuropática. *Rev dor* 2016;17(Suppl 1):11–14.
5. Vieira EBM, Garcia JBS, Silva AAM, Araújo RLTM, Jansen RCS. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. *J Pain Symptom Manag* 2012;44(2):239–251.
6. Torrance N, Lawson KD, Afolabi E, Bennett MI, Serpell MG, Dunn KM, Smith BH. Estimating the burden of disease in chronic pain with and without neuropathic characteristics: Does the choice between the EQ-5D and SF-6D matter? *Pain* 2014;155(10):1996–2004.
7. Gureje O, Korff M V, Simon GE, Gater R. Persistent Pain and Well-being. *JAMA* 2015;280(2):147–152.
8. Attal N, Lanteri-minet M, Laurent B, Fermanian J, Bouhassira D. The specific disease burden of neuropathic pain : Results of a French nationwide survey. *Pain* 2011;152(12):2836–2843.
9. Kronborg C, Handberg G, Axelsen F. Health care costs , work productivity and activity impairment in non-malignant chronic pain patients. *Eur J Heal Econ* 2009;10(1):5–13.
10. Fonseca J, Lopes M, Ramos A. Pessoas com dor e necessidades de intervenção: revisão sistemática da literatura. *Rev Bras Enferm* 2013;66(5):771–778.
11. Gaskin DJ, Richard P. The Economic Costs of Pain in the United States. *J Pain* 2012;13(8):715–724.
12. Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2019;33:1–10.
13. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: Systematic review, meta-analysis and updated NeuPSig recommendations. *Lancet Neurol* 2015;14(2):162–173.

14. Kerstman E, Ahn S, Battu S, Tariq S, Grabois M. Neuropathic pain. *Handb Clin Neurol* 2013;110:175–187.
15. Szok D, Tajti J, Nyári A, Vécsei L. Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain. *Behav Neurol* 2019;2019:1–13.
16. Bassani T, Vital M, Rauh L. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. *2015;73(7):616–623.*
17. Tansey M, McCoy M, Frank-Cannon T. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 2007;208(1):1–25.
18. Pablos R, Herrera A, Villarán R, Cano J, Machado A. Dopamine-dependent neurotoxicity of lipopolysaccharide in substantia nigra. *FASEB J* 2005;19(3):407–9.
19. Li Z, Jansen M, Ogburn K, Salvatierra L, Hunter L, Mathew S, et al. Neurotoxic prostaglandin J2 enhances cyclooxygenase-2 expression in neuronal cells through the p38MAPK pathway: A death wish? *J Neurosci Res* 2004;78(6):824–836.
20. Uryu K, Giasson BI, Longhi L, Martinez D, Murray I, Conte V, Al. E. Age-dependent synuclein pathology following traumatic brain injury in mice. *Exp Neurol* 2003;184(1):214–224.
21. Mrak R, Griffin W. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 2005;26(3):349–354.
22. Jung Y, Surh Y. Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radic Biol Med* 2001;30(12):1407–1417.
23. Sousa AA, Braga SA RSH. Neuroinflamação na doença de Parkinson. *EVS* 2016;43(1):79–89.
24. Moritz TA, Snowdon DA, Peiris CL. Combining aquatic physiotherapy with usual care physiotherapy for people with neurological conditions: A systematic review. *Physiother Res Int* 2019:1–15.
25. Becker BE. Aquatic Therapy: Scientific Foundations and Clinical Rehabilitation Applications. *PMR* 2009;1(9):859–872.
26. Roberts LA, Nosaka K, Coombes JS, Peake JM. Cold water immersion enhances recovery of submaximal muscle function after resistance exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;307(8):R998–R1008.
27. Yanagisawa O, Kudo H, Takahashi N, Yoshioka H. Magnetic resonance imaging evaluation of cooling on blood flow and oedema in skeletal muscles after exercise. *Eur J Appl Physiol* 2004;91(5–6):737–740.
28. Brunt VE, Wiedenfeld-Needham K, Comrada LN, Minson CT. Passive heat therapy protects against endothelial cell hypoxia-reoxygenation via effects of elevations in

temperature and circulating factors. *J Physiol* 2018;596(20):4831–4845.

29. Hoekstra SP, Bishop NC, Faulkner SH, Bailey SJ, Leicht CA. Acute and chronic effects of hot water immersion on inflammation and metabolism in sedentary, overweight adults. *J Appl Physiol* 2018;125(6):2008–2018.

30. Shoemaker LN, Wilson LC, Lucas SJE, Machado L, Thomas KN, Cotter JD. Swimming-related effects on cerebrovascular and cognitive function. *Physiol Rep* 2019;7(20):1–13.

31. Hashide R, Yoshida K, Kotaki K, Watanabe T, Watahiki R, Takahashi S, Sato K, Anzai J. Use of anionic polysaccharides for the preparation of insulin-containing layer-by-layer films and their pH stability. *Polym Bull* 2012;69.

32. Sato D, Onishi H, Yamashiro K, Iwabe T, Shimoyama Y, Maruyama A. Water immersion to the femur level affects cerebral cortical activity in humans: Functional near-infrared spectroscopy study. *Brain Topogr* 2012;25(2):220–227.

33. Kojima D, Nakamura T, Banno M, Umemoto Y, Kinoshita T, Ishida Y, Tajima F. Head-out immersion in hot water increases serum BDNF in healthy males. *Int J Hyperth* 2018;34(6):834–839.

34. Zivi I, Maffia S, Ferrari V, Zarucchi A, Molatore K, Maestri R, Frazzitta G. Effectiveness of aquatic versus land physiotherapy in the treatment of peripheral neuropathies: a randomized controlled trial. *Clin Rehabil* 2018;32(5):663–670.

35. Medeiros P, Freitas RL, Boccella S, Iannotta M, Belardo C, Mazzitelli M, Romano R, De Gregorio D, Coimbra NC, Palazzo E, et al. Characterization of the sensory, affective, cognitive, biochemical, and neuronal alterations in a modified chronic constriction injury model of neuropathic pain in mice. *J Neurosci Res* 2019;98(2):338–352.

36. Zhuo M. Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci* 2008;31(4):199–207.

37. Chung G, Kim CY, Yun YC, Yoon SH, Kim MH, Kim YK, Kim SJ. Upregulation of prefrontal metabotropic glutamate receptor 5 mediates neuropathic pain and negative mood symptoms after spinal nerve injury in rats. *Sci Rep* 2017;7(9743):1–14.

38. Apkarian AV, Sosa Y, Sonty S, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, Gitelman DR. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J Neurosci* 2004;24(46):10410–10415.

39. Ji G, Neugebauer V. Modulation of medial prefrontal cortical activity using in vivo recordings and optogenetics. *Mol Brain* 2012;5(36):1–10.

40. Dworkin R. An Overview of Neuropathic Pain: Syndromes, Symptoms, Signs, and Several Mechanisms. 2002;18:343–349.

41. Alvites, RA C, SS P, MV B, G R, S G, ASP VA, AC M. Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. *Cogent Med* 2018;5(1):1–45.

42. Radić B, Radić P, Duraković D. Peripheral nerve injury in sports. *Acta Clin Croat* 2018;57(3):561–569.
43. Hewson DW, Bedfordth NM, Hardman JG. Peripheral nerve injury arising in anaesthesia practice. *Anaesthesia* 2018;73(Suppl. 1):51–60.
44. Gierthmühlen J, Baron R. Neuropathic Pain. *Semin Neurol* 2016;36(5):462–468.
45. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* 2004;16(5):1–7.
46. Dieleman JP, Kerklaan J, Huygen FJPM, Bouma PAD, Sturkenboom MCJM. Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain* 2008;137(3):681–688.
47. Descalzi G, Mitsi V, Purushothaman I, Gaspari S, Avrampou K, Loh YE, Shen L, Zachariou V. Neuropathic pain promotes gene expression adaptations in brain networks involved in stress and depression. *Sci Signal* 2017;10(471).
48. Siniscalco D, Rossi F, Maione S. Molecular Approaches for Neuropathic Pain Treatment. 2007:1783–1787.
49. Finnerup NB, Attal N. Pharmacotherapy of neuropathic pain: time to rewrite the rulebook? *Pain Manag* 2016;6(1):1–3.
50. Teixeira MJ. Mechanisms of Pain. 2001;80(1):22–62.
51. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Ann Neurol* 1988;23(2):193–196.
52. Devor M, Wall PD. Effect of peripheral nerve injury on receptive fields of cells in the cat spinal cord. *Neurol J Comp* 1981;199(2):277–291.
53. Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron* 2012;73(4):638–652.
54. Serra J, Bostock H, Solà R, Aleu J, García E, Cokic B, Navarro X, Quiles C. Microneurographic identification of spontaneous activity in C-nociceptors in neuropathic pain states in humans and rats. *Pain* 2012;153(1):42–55.
55. He XH, Zang Y, Chen X, Pang RP, Xu JT, Zhou X, Wei XH, Li YY, Xin WJ, Qin ZH, et al. TNF- α contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury. *Pain* 2010;151(2):266–279.
56. Schäfers M, Lee DH, Brors D, Yaksh TL, Sorkin LS. Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor- α after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 2003;23(7):3028–3038.
57. Clifford JW. Central Sensitisation - apuntes. *Pain* 2012;152(3 Suppl):1–31.
58. Baron R, Hans G, Dickenson A. Peripheral input and its importance for central

sensitization. *Ann Neurol* 2014;74(5):630–6.

59. Peyron R. Functional brain imaging: What has it brought to our understanding of neuropathic pain? A special focus on allodynic pain mechanisms. *Pain* 2016;157(1 Suppl):S67-71.

60. Gagnon M, Bergeron MJ, Lavertu G, Castonguay A, Tripathy S, Bonin RP, Perez-Sanchez J, Boudreau D, Wang B, Dumas L, et al. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nat Med* 2013;19(11):1524–1528.

61. Tsuda M, Beggs S, Salter MW, Inoue K. Microglia and intractable chronic pain. *Glia* 2013;61(1):55–61.

62. Bobinski F, Teixeira JM, Sluka KA, Santos ARS. Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. *Pain* 2018;159(3):437–450.

63. Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol* 2010;229(1–2):26–50.

64. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8(12):958–969.

65. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12(1):64–76.

66. Yu X, Liu H, Hamel KA, Morvan MG, Yu S, Leff J, Guan Z, Braz JM, Basbaum AI. Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. *Nat Commun* 2020;11(1):1–12.

67. Ramer MS, Murphy PG, Richardson PM, Bisby MA. Spinal nerve lesion-induced mechanoallodynia and adrenergic sprouting in sensory ganglia are attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Pain* 1998;78(2):115–121.

68. Shubayev VI, Myers RR. Upregulation and interaction of TNF α and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Res* 2000;855(1):83–89.

69. Hung AL, Lim M, Doshi TL. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. *Scand J Pain* 2017;17:287–293.

70. Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LGA, Santos ARS. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience* 2011;194:337–348.

71. Sobeh M, Mahmoud MF, Rezaq S, Abdelfattah MAO, Mostafa I, Alsemeh AE, El-Shazly AM, Yasri A, Wink M. Haematoxylon campechianum extract ameliorates neuropathic pain via inhibition of NF- κ B/TNF- α /NOX/iNOS signalling pathway in a rat model of chronic constriction injury. *Biomolecules* 2020;10(3):1–31.

72. Del Rey A, Yau HJ, Randolph A, Centeno M V, Wildmann J, Martina M, Besedovsky

HO, Apkarian AV. Chronic neuropathic pain-like behavior correlates with IL-1 β expression and disrupts cytokine interactions in the hippocampus. *Pain* 2011;152(12):2827–2835.

73. Eliav E, Benoliel R, Herzberg U, Kalladka M, Tal M. The role of IL-6 and IL-1 β in painful perineural inflammatory neuritis. *Brain Behav Immun* 2009;23(4):474–484.

74. Wei XH, Yang T, Wu Q, Xin WJ, Wu JL, Wang YQ, Zang Y, Wang J, Li YY, Liu XG. Peri-sciatic administration of recombinant rat IL-1 β induces mechanical allodynia by activation of src-family kinases in spinal microglia in rats. *Exp Neurol* 2012;234(2):389–397.

75. Makker PGS, Duffy SS, Lees JG, Perera CJ, Tonkin RS, Butovsky O, Park SB, Goldstein D, Moalem-taylor G. Characterisation of Immune and Neuroinflammatory Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *PLoS One* 2017;12(1):1–24.

76. Fonseca M, Davoli-Ferreira M, Santa-Cecília F, Guimarães R, Oliveira F, Kusuda R, Al E. IL-27 Counteracts Neuropathic Pain Development Through Induction of IL-10. *Front Immunol* 2020;10:1–14.

77. Yanik BM, Dauch JR, Cheng HT. Interleukin-10 reduces neurogenic inflammation and pain behavior in a mouse model of type 2 diabetes. *J Pain Res* 2020;13:3499–3512.

78. Mietto B, Kroner X, Girolami E, Santos-nogueira X, Zhang J, David S. Role of IL-10 in Resolution of Inflammation and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci* 2015;35(50):16431–16442.

79. Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R. The Role of Glia and the Immune System in the Development and Maintenance of Neuropathic Pain. *Pain Pr* 2010;10(3):167–184.

80. Gwak YS, Kang J, Unabia GC, Hulsebosch CE. NIH Public Access. *Exp Neurol* 2013;234(2):362–372.

81. Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(1):23–36.

82. Zhang Z, Jiang B, Gao Y. Chemokines in neuron–glial cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain. *Cell Mol Life Sci* 2017;74(18):3275–3291.

83. Zhang ZJ, Cao DL, Zhang X, Ji RR, Gao YJ. Chemokine contribution to neuropathic pain: Respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons. *Pain* 2013;154(10):2185–2197.

84. Tzeng SF, Kahn M, Liva S, De Vellis J. Tumor necrosis factor- α regulation of the *Id* gene family in astrocytes and microglia during CNS inflammatory injury. *Glia* 1999;26(2):139–152.

85. Beggs S, Trang T, Salter MW. P2X4R + microglia drive neuropathic pain. *Nat Neurosci* 2012;15(8):1068–1073.

86. Liu H, Leak RK, Hu X. Neurotransmitter receptors on microglia. *Stroke Vasc Neurol* 2016;1(2):52–58.
87. Calvo M, Bennett DLH. The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 2012;234(2):271–282.
88. Scholz J, Abele A, Marian C, Häussler A, Herbert TA, Woolf CJ, Tegeder I. Low-dose methotrexate reduces peripheral nerve injury-evoked spinal microglial activation and neuropathic pain behavior in rats. *Pain* 2008;138(1):130–142.
89. Tsuda M, Masuda T, Kitano J, Shimoyama H, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. IFN- γ receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(19):8032–8037.
90. Calvo M, Zhu N, Tsantoulas C, Ma Z, Grist J, Loeb JA, Bennett DLH. Neuregulin-ErbB signaling promotes microglial proliferation and chemotaxis contributing to microgliosis and pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 2010;30(15):5437–5450.
91. Ellis A, Bennett DLH. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *Br J Anaesth* 2013;111(1):26–37.
92. Martínez-Tapia R, Estrada-Rojo F, Hernández-Chávez A, Barajas-Martínez A, Flores-Avalos L, Chavarría A, Al E. Una nueva vía de drenaje cerebral: el sistema glinfático. Revisión histórica y conceptual. *Rev Mex Neuroci* 2018;19(1):104–116.
93. DeLeo JA, Tawfik VL, Lacroix-fralish ML. The tetrapartite synapse: Path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain* 2006;122(1–2):17–21.
94. Kofuji P, Newman E. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 2004;129(4):1045–1056.
95. Romero-Sandoval A, Chai N, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. A Comparison of Spinal Iba1 and GFAP expression in Rodent Models of Acute and Chronic Pain. *Brain Res* 2008;1219:116–126.
96. Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol* 1999;157(2):289–304.
97. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005;50(4):427–434.
98. Davies AM. Neurotrophins giveth and they taketh away How the clock sees the light. *Nat Neurosci* 2008;11(6):627–628.
99. Ceni C, Unsain N, Zeinieh MP, Barker PA. Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handb Exp Pharmacol* 2014;220:193–221.
100. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11(3):272–280.
101. Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res*

2006;55(1):1–10.

102. Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG. Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci* 2010;33:325–347.

103. Mantyh PW, Koltzenburg M, Mendell LM, Tive L, Shelton DL. Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain. *Anesthesiology* 2011;115(1):189–204.

104. Dogrul A, Gul H, Yesilyurt O, Ulas UH, Yildiz O. Systemic and spinal administration of etanercept, a tumor necrosis factor alpha inhibitor, blocks tactile allodynia in diabetic mice. *Acta Diabetol* 2011;48(2):135–142.

105. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* 2011;8(1):100–113.

106. Leung L, Cahill CM. TNF- α and neuropathic pain - a review. *J Neuroinflammation* 2010;7(27):1–11.

107. Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: Mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:507–538.

108. Luo XG, Rush RA, Zhou XF. Ultrastructural localization of brain-derived neurotrophic factor in rat primary sensory neurons. *Neurosci Res* 2001;39(4):377–384.

109. González-Martínez T, Fariñas I, Del Valle ME, Feito J, Germanà G, Cobo J, Vega JA. BDNF, but not NT-4, is necessary for normal development of Meissner corpuscles. *Neurosci Lett* 2005;377(1):12–15.

110. Fukuoka T, Noguchi K. Contribution of the spared primary afferent neurons to the pathomechanisms of neuropathic pain. *Mol Neurobiol* 2002;26(1):57–67.

111. Michael G, Averill S, Shortland P, Yan Q, Priestley J. Axotomy results in major changes in BDNF expression by dorsal root ganglion cells: BDNF expression in large trkB and trkC cells, in pericellular baskets, and in projections to deep dorsal horn and dorsal column nuclei. *Eur J Neurosci* 1999;11(10):3539–3551.

112. Malcangio M, Lessmann V. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24(3):116–121.

113. Zhao X, Liu J, Guan R, Shen Y, Xu P, Xu J. Estrogen affects BDNF expression following chronic constriction nerve injury. *Neuroreport* 2003;14(12):1627–1631.

114. Kitayama T, Morita K, Motoyama N, Dohi T. Down-regulation of zinc transporter-1 in astrocytes induces neuropathic pain via the brain-derived neurotrophic factor - K⁺-Cl⁻ co-transporter-2 signaling pathway in the mouse spinal cord. *Neurochem Int* 2016;101:120–131.

115. Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient

underlying neuropathic pain. *Nature* 2005;438(7070):1017–1021.

116. Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K, et al. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J Cell Biol* 2002;159(5):747–752.

117. Zhang Z, Wang X, Wang W, Lu YG, Pan ZZ. Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Downregulation of Brainstem K⁺-Cl⁻ Cotransporter and Cell-Type-Specific GABA Impairment for Activation of Descending Pain Facilitation. *Mol Pharmacol* 2013;84(4):511–520.

118. Coull JAM, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, S k A, Koninck P, Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 2003;424(6951):938–42.

119. Slack SE, Pezet S, McMahon SB, Thompson SWN, Malcangio M. Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 2004;20(7):1769–1778.

120. Di Luca M, Gardoni F, Finardi A, Pagliardini S, Cattabeni F, Battaglia G, Missale C. NMDA receptor subunits are phosphorylated by activation of neurotrophin receptors in PSD of rat spinal cord. *Neuroreport* 2001;12(6):1301–1305.

121. Lu VB, Biggs JE, Stebbing MJ, Balasubramanyan S, Todd KG, Lai AY, Colmers WF, Dawbarn D, Ballanyi K, Smith PA. Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *J Physiol* 2009;587(5):1013–1032.

122. Lu VB, Colmers WF, Smith PA. Long-term actions of BDNF on inhibitory synaptic transmission in identified neurons of the rat substantia gelatinosa. *J Neurophysiol* 2012;108(2):441–452.

123. Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, Bardoni R. BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol* 2008;85(3):297–317.

124. Merighi A, Bardoni R, Salio C, Lossi L, Ferrini F, Prandini M, Zonta M, Gustincich S, Carmignoto G. Presynaptic functional trkB receptors mediate the release of excitatory neurotransmitters from primary afferent terminals in lamina II (substantia gelatinosa) of postnatal rat spinal cord. *Dev Neurobiol* 2008;68(4):457–475.

125. Kitayama T. The Role of Astrocytes in the Modulation of K⁺-Cl⁻-Cotransporter-2 Function. *Int J Mol Sci* 2020;21(24):1–13.

126. Chimenti RL, Frey-Law LA, Sluka KA. A mechanism-based approach to physical therapist management of pain. *Phys Ther* 2018;98(5):302–314.

127. Salm DC, Belmonte LAO, Emer AA, Leonel LS, Brito RN, Rocha CC, Martins TC, dos Reis DC, Moro ARP, Mazzardo-Martins L, et al. Aquatic exercise and Far Infrared (FIR) modulates pain and blood cytokines in fibromyalgia patients: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *J Neuroimmunol* 2019;337:1–35.

128. Brito RG, Rasmussen LA, Sluka KA. Regular physical activity prevents development of chronic muscle pain through modulation of supraspinal opioid and serotonergic mechanisms. *Pain Rep* 2017;2(5):1–12.
129. Gurpinar B, Kara B, Idiman E. Effects of aquatic exercises on postural control and hand function in Multiple Sclerosis : Halliwick versus Aquatic Plyometric Exercises : a randomised trial. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2020;20(2):249–255.
130. Cha H, Shin Y, Kim M. ScienceDirect Effects of the Bad Ragaz Ring Method on muscle activation of the lower limbs and balance ability in chronic stroke : A randomised controlled trial. *Hong Kong Physiother J* 2017;37:39–45.
131. Chon SC, Oh DW, Shim JH. Watsu approach for improving spasticity and ambulatory function in hemiparetic patients with stroke. *Physiother Res Int* 2009;14(2):128–136.
132. Coradini JG, Kakihata CMM, Kunz RI, Errero TK, Bonfleur ML BG. Evaluation of grip strength in normal and obese Wistar rats submitted to swimming with overload after median nerve compression. *Rev Bras Reumatol (English Ed)* 2015;55(1):43–47.
133. Caspersen C, Powell K, Christenson G. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Heal Rep* 1985;100(2):126–131.
134. Christensen RH, Wedell-Neergaard AS, Lehrskov LL, Legaard GE, Dorph E, Larsen MK, Launbo N, Fagerlind SR, Seide SK, Nymand S, et al. Effect of Aerobic and Resistance Exercise on Cardiac Adipose Tissues: Secondary Analyses from a Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol* 2019;4(8):778–787.
135. Yan J, Dai X, Feng J, Yuan X, Li J, Yang L, Zuo P, Fang Z, Liu C, Hsue C, et al. Effect of 12-Month Resistance Training on Changes in Abdominal Adipose Tissue and Metabolic Variables in Patients with Prediabetes: A Randomized Controlled Trial. *J Diabetes Res* 2019;2019:1–10.
136. Moore SA, Hallsworth K, Jakovljevic DG, Blamire AM, He J, Ford GA, Rochester L, Trenell MI. Effects of Community Exercise Therapy on Metabolic, Brain, Physical, and Cognitive Function Following Stroke: A Randomized Controlled Pilot Trial. *Neurorehabil Neural Repair* 2015;29(7):623–635.
137. Tomas-carus P, Ortega-alonso A, Pietilainen KH, Santos V, Gonçalves H, Ramos J, Raimundo A. A randomized Controlled Trial on the Effects of Combined Aerobic-Resistance Exercise on Muscle Strength and Fatigue, Glycemic Control and health-related quality of life of type 2 diabetes patients. *J Sport Med Phys Fit* 2016;56(2):572–8.
138. Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(7):3017–3022.
139. Rosety-Rodriguez M, Camacho A, Rosety I, Fornieles G, Rosety MA, Diaz AJ, Bernardi M, Rosety M, Ordonez FJ. Low-grade systemic inflammation and leptin levels were improved by arm cranking exercise in adults with chronic spinal cord injury. *Arch*

Phys Med Rehabil 2014;95(2):297–302.

140. Souza R, Moraes S, Augusto R, Zanona A, Matos D, Aidar F, Costa B. Endurance training on rodent brain antioxidant capacity: A meta-analysis. *Neurosci Res* 2018;145:1–9.

141. Chen Y, Nader G, Baar K, Fedele M, Hoffman E, Esser K. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. *J Physiol* 2002;545(1):27–41.

142. M C, S J, E S-K, SJ C, B K, J L. Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. *J Physiol Pharmacol* 2015;66(4):539–547.

143. Acikgoz O, Aksu I, Topcu A, Kayatekin B. Acute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus , prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett* 2006;406(1–2):148–151.

144. Camiletti-Moirón D, Aparicio V, Nebot E, Medina G, Martínez R, Kapravelou G et al. High-intensity Exercise Modifies the Effects of Stanazolol on Brain Oxidative Stress in Rats. *Int J Sport Med* 2015;36(12):984–991.

145. Carter HH, Spence AL, Pugh CJA, Ainslie P, Naylor LH, Green DJ. Cardiovascular responses to water immersion in humans: Impact on cerebral perfusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;306(9):636–641.

146. Gueita-Rodríguez J, Hoyas-Avila S, Palacios-Cena D, Molina-Rueda F. [Effects of vertical water immersion on the nervous system: a systematic review]. *Rev Neurol* 2019;68(5):181–189.

147. Sato D, Yamashiro K, Onishi H, Shimoyama Y, Yoshida T, Maruyama A. The effect of water immersion on short-latency somatosensory evoked potentials in human. *BMC Neurosci* 2012;13(1):1–6.

148. Fernandes G, Jennings F, Cabral M, Buosi A, Natour J. Swimming Improves Pain and Functional Capacity of Patients With Fibromyalgia: A Randomized Controlled Trial. *Arch Phys Med Rehabil* 2016;97(8):1269–75.

149. Cruz SP. Mental health in Parkinson's disease after receiving aquatic therapy: a clinical trial. *Acta Neurol Belg* 2018;119:193–200.

150. Ortega E, García JJ, Bote ME, Martín-Cordero L, Escalante Y, Saavedra JM, Northoff H, Giraldo E. Exercise in fibromyalgia and related inflammatory disorders: Known effects and unknown chances. *Exerc Immunol Rev* 2009;15:42–65.

151. Faria RS, Bereta ÁLB, Reis GHT, Santos LBB, Pereira MSG, Cortez PJO, Dias EV. Effects of the swimming exercise on the extinction of fear memory in rats. *J Neurophysiol* 2018;120(5):2649–2653.

152. Falcai MJ, Zamarioli A, Leoni GB, Sousa Neto MD, Volpon JB. Swimming activity prevents the unloading induced loss of bone mass, architecture, and strength in rats. *Biomed Res Int* 2015;2015:1–8.

153. Qin L, Yao ZQ, Chang Q, Zhao YL, Liu NN, Zhu XS, Liu QQ, Wang LF, Yang AG, Gao CF, et al. Swimming attenuates inflammation, oxidative stress, and apoptosis in a rat model of dextran sulfate sodium-induced chronic colitis. *Oncotarget* 2017;8(5):7391–7404.
154. Tian J, Yu T, Xu Y, Pu S, Lv Y, Zhang X, Du D. Swimming Training Reduces Neuroma Pain by Regulating Neurotrophins. *Med Sci Sports Exerc* 2018;50(1):54–61.
155. Martins DF, Mazzardo-Martins L, Soldi F, Stramosk J, Piovezan AP, Santos ARS. 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.
156. Chen YW, Li YT, Chen YC, Li ZY, Hung CH. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesth Analg* 2012;114(6):1330–1337.
157. Bertolini GRF, Nascimento CM, Artifon EL, Cunha DM, Meireles A. Treinamento com natação sobre a avaliação funcional da nocicepção ciática em ratos. *Rev Bras Reum* 2011;51(3):254–259.
158. Farzad B, Rajabi H, Gharakhanlou R, Allison DJ, Hayat P, Jameie SB. Swimming training attenuates allodynia and hyperalgesia induced by peripheral nerve injury in an adult male rat neuropathic model: Effects on irisin and GAD65. *Pain Med* 2018;19(11):2236–2245.
159. Shen J, Fox LE, Cheng J. Swim Therapy Reduces Mechanical Allodynia and Thermal Hyperalgesia Induced by Chronic Constriction Nerve Injury in Rats. *Pain Med* 2013;14(4):516–525.
160. Aghdam AM, Shahabi P, Karimi-Sales E, Ghiasi R, Sadigh-Eteghad S, Mahmoudi J, Alipour MR. Swimming exercise induced reversed expression of miR-96 and its target gene Na V 1.3 in diabetic peripheral neuropathy in rats. *Chin J Physiol* 2018;61(2):124–129.
161. Sun L, Lv Y, Tian J, Yu T, Niu F, Zhang X, Du D. Regular Swimming Exercise Attenuated Neuroma Pain in Rats: Involvement of Leptin and Adiponectin. *J Pain* 2019;20(9):1112–1124.
162. Kuphal KE, Fibuch EE, Taylor BK. Extended Swimming Exercise Reduces Inflammatory and Peripheral Neuropathic Pain in Rodents. *2007*;8(12):989–997.
163. Rossi DM, Valenti VE, Navega MT. Exercise training attenuates acute hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic female rats. *Clin (Sao Paulo)* 2011;66(9):1615–1619.
164. Hutchinson KJ, Gómez-Pinilla F, Crowe MJ, Ying Z, Basso DM. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* 2004;127(6):1403–1414.
165. Almeida C, Demaman A, Kusuda R, Cadetti F, Ravanelli MI, Queiroz AL, Sousa TA, Zanon S, Silveira LR, Lucas G. Exercise therapy normalizes BDNF upregulation

and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* 2015;156(3):504–513.

166. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol* 2020;18(7):e3000411.

167. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16(2):109–110.

168. Daniel WW, Cross CL. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. 9th ed. John Wiley & Sons, editor. New York; 2008. 958 p.

169. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve crush injuries—a model for axonotmesis. *J Exp Neurol* 1994;127(2):284–290.

170. Liu W, Xue X, Xia J, Liu J, Qi Z. Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins. *J Affect Disord* 2017;227:126–135.

171. Mazzardo-Martins L, Martins DF, Marcon R, Ubirajara D, Sigwalt R, Gadotti M, Guglielmo LGA, Roberto A, Santos S. High-Intensity Extended Swimming Exercise Reduces Pain-Related Behavior in Mice: Involvement of Endogenous Opioids and the Serotonergic System. *J Pain* 2010;11(12):1384–1393.

172. Ferreira JCB, Rolim NPL, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(8):760–765.

173. Urhausen A, Coen B, Weiler B, Kindermann W. Individual anaerobic threshold and maximum lactate steady state. *Int J Sports Med* 1993;14(3):134–139.

174. Shepherd AJ, Mohapatra DP. Pharmacological validation of voluntary gait and mechanical sensitivity assays associated with inflammatory and neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology* 2018;130:18–29.

175. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.

176. Brasil CJRNM. Diretriz Brasileira para o Cuidado ea Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica-DBCA. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. 2016:1–50.

ANEXO A – APROVAÇÃO CEUA UNISUL



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

Palhoça, 23 de fevereiro de 2021
Registro na CEUA Nº 21.007.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Franciane Bobinski

Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Estudo pré-clínico sobre os efeitos da natação nas interações neuroimunes após a lesão nervosa periférica e suas consequências na dor e neuroinflamação”, registrada com o nº 21.007.4.01.IV, sob a responsabilidade de Franciane Bobinski - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 25 de fevereiro de 2021.

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

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

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão