



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

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA ANXA1-FPR2/ALX NA ANTI-
HIPERALGESIA PRODUZIDA PELA NATAÇÃO CONTÍNUA E INTERVALADA EM
UM MODELO NÃO CLÍNICO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA**

DANIELA DERO LÜDTKE

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA ANXA1-FPR2/ALX NA ANTI-
HIPERALGESIA PRODUZIDA PELA NATAÇÃO CONTÍNUA E INTERVALADA EM
UM MODELO NÃO CLÍNICO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA**

LINHA DE PESQUISA: Neurociências.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Palhoça
2021

L97 Lüdtke, Daniela Dero, 1993-

Avaliação do envolvimento da via ANXA1-FPR2/ALX na anti-hiperalgesia produzida pela natação contínua e intervalada em um modelo não clínico de dor pós-operatória / Daniela Dero Lüdtke. – 2021.

102 f. : il. color.; 30 cm

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

Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins

1. Dor pós-operatória - Tratamento. 2. Natação. 3. Treinamento intervalado de alta intensidade. 4. Anexina A1. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.0472



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

Avaliação do envolvimento da via Anx1-FPR2/ALX na anti-hiperalgesia produzida pela
natação contínua e intervalada em um modelo não clínico de dor pós-operatória

DANIELA DERO LÜDTKE
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 19 de agosto de 2021.

Doutor Daniel Fernandes Martins Comim (Orientador) *Daniel F. Martins.*

Doutora Alexandra Susana Latini (Avaliador externo - UFSC) – *presente por
videoconferência*

Doutora Deborah de Camargo Hizume Kunzler (Avaliador externo - UDESC) – *presente
por videoconferência*

Doutora Anna Paula Piovezan (Avaliador interno - PPGCS) – *presente por
videoconferência*

Doutora Franciane Bobinski (Avaliador interno - PPGCS) – *presente por videoconferência*

Professor Doutor Jefferson Luiz Traebert
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

- Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina, Sede, Reitoria - Av. José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
- Unisul Região Sul
 - Campus Tubarão - Avenida José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon, Caixa Postal 370 - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
 - Campus Araranguá - Rodovia Governador Jorge Lacerda, 3201, Bairro Urussanguinha - 88905-355, Araranguá, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3521-3000
 - Campus Braço do Norte - Rodovia SC 370, 1023, Rio Bonito - 88750-000, Braço do Norte, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3925
 - Campus Içara - Rua Linha Três Ribeirões, Loteamento Centenário, 250, Bairro Liri - 88820-000, Içara, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3460
- Unisul Região Grande Florianópolis
 - Campus Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, 88137-270, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1000
 - Campus Florianópolis - Rua Dlb Mussi, 366, Centro - 88015-110, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
 - Rua Trajano, 219, Centro - 88010-010, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
- Campus Unisul Digital - Av. Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - 88137-900, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1200

Dedicatória

À pessoa que foi parte integrante do processo e me permitiu, com tanto amor e zelo, chegar até aqui: Cristian Vilson de Freitas (amo-te infinitamente).

AGRADECIMENTOS

Há infinitas razões para agradecer – especialmente a Deus – pelo presente que é a vida, a fé, a saúde e a família. Nasci em um berço de ouro, repleto dos maiores valores e exemplos. Obrigada, pai e mãe, Vilmar e Zilda, por me gerar, criar, educar e amar. Eu nada seria sem vocês! Gratidão por me possibilitarem viver as oportunidades e abrir o caminho que vocês mesmos não puderam seguir. Vocês são meus primeiros exemplos e a minha maior motivação. Obrigada por TUDO!

Irmãs, Josi e Ana, minhas primeiras inspirações de vida e intelecto, aquelas que me ensinaram a ler e a escrever, tiraram dúvidas e seguraram minha mão muitas vezes, a Josi principalmente (não foi fácil né, irmã [risos]). Eu sempre tive bons exemplos e é por isso que cheguei até aqui. Obrigada, “família do canudo, onde tá um, tá tudo”, vocês são porto seguro, referência terrestre e a razão do meu viver.

Cristian, meu amor, chegou de mansinho, mas veio para ficar e fazer a diferença. E que diferença, hein? Afirmo, com todas as letras: sem você eu não teria finalizado o doutorado. Você foi O cara e me fez acreditar, lutar, persistir e não desistir. O caminho não é fácil, mas a chegada sempre parece que sim. Você, somente você, sabe dos risos e dos choros e foi rocha para me manter de pé. Gratidão por ser o melhor companheiro, a melhor base e o sonho de qualquer mulher. Eu te amo e esse doutorado é nosso, nós conseguimos! Deus é bom o tempo todo (frase que a gente falou inúmeras vezes).

Meus afilhados e sobrinho, Eloiza, Ricardo e Lucas, por “entender” toda a minha ausência (não foi pouca, eu sei) durante seus primeiros anos de vida. Peço apenas tempo para aproveitar cada segundo ao lado de vocês e muito Didi-Loli-Lulu para gravar, assim como muita energia para correr atrás do meu gigante Ricardinho.

Sheyla, minha irmã de coração e comadre, mesmo “de longe” esteve presente e acreditando em mim. Eu chegava dizendo: “consegui”; e ela respondia: “eu já sabia, só tu que não sabias [choro]”. A cada dia descubro por que nossa conexão é tão forte. Amo você infinito e além, em todas as vidas.

Meus pacientes e alunos, por serem peças fundamentais; por me fazerem querer ir além e, em especial, minha estrela dourada: Leonila Kraus Scheidt (em memória), por me ensinar tanto e, hoje, guiar o meu caminho para ser e fazer o bem.

Meus professores, desde a graduação até a pós-graduação, por mostrar, conduzir e completar minha educação/formação. Destaco os integrantes do PPGCS,

carinhosamente lembrados: prof. Jefferson (autêntico líder e correto), prof.^a Anna Paula (a doçura em pessoa e na arte de ensinar), prof.^a Franciane (que didática é essa? Quando crescer, quero ser igual a você) e, com certeza, minha maior inspiração no ensino e na pesquisa: professor Daniel Fernandes Martins. Sem palavras para expressar estes mais de 10 anos de aprendizado. Sou e serei eternamente grata por nossos caminhos terem se cruzado, desde a disciplina Neuroanatomia, na segunda fase do curso de Fisioterapia, até aqui. Você abriu a porta do LANEX e, juntos, começamos toda esta jornada. Foram alguns PIBITIs, um TCC, um mestrado e um doutorado, fora os demais trabalhos realizados em parcerias. Vi você evoluir como professor e se tornar a referência que é hoje. Tenho imenso orgulho de dizer que sou sua orientanda há 3 “gerações”. Um dia ouvi: “é bom trocar de orientador, vivenciar outras ideias e aprender coisas novas”. Eu respondi: “não se mexe naquilo que está dando certo”. A resposta está aí. Você é o responsável pela minha formação acadêmica e profissional, pela minha linha de pesquisa, pela minha vontade de estudar, pesquisar e nunca parar (até porque você é ligado no 220 e, a cada dia, tem uma ideia nova [risos]). Hoje, quando você me explica algo e eu entendo teu raciocínio, sinto-me realizada, e acredito que você também. Professor, meu grande mestre e guia, obrigada por tudo e por todas as portas que você abriu para mim. Não tem preço, gratidão eterna, meu amigo (acho que posso te chamar assim).

Aproveito para estender os agradecimentos à prof.^a Leidiane, por ter me ensinado, pacientemente, todo o início da parte experimental, bem como ao professor Adair (em memória), por permitir acesso ao LANDI-UFSC para que eu pudesse iniciar na pesquisa.

Não podem faltar todos os meus colegas do laboratório: Daiana, Paula, Taynah, Bruninha, Sarah, Julia's, Kamila, Verônica, Nathalia, Fernanda's, Rafa, Ana e Georgia, por todo o processo. Com certeza, vocês foram peças fundamentais para a conclusão desta e de tantas outras etapas. Nosso grupo é diferenciado e eu espero que continue assim, com sentimento de fraternidade coletiva e solidariedade. Juntos, somos mais fortes, e um “viva!” ao eterno LANEX. Agradeço também à UNISUL, ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro para a conclusão desta etapa (o presente trabalho foi realizado com apoio da [Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior \(CAPES\)](#) – Brasil – Código de Financiamento 001).

Agradecimento mais do que especial aos seres de luz, os camundongos, que deram a vida para salvar outras vidas, abrindo portas para que a ciência vá além.

Desejo que possamos evoluir neste processo e aprender a respeitar, cada dia mais, vocês.

Sem mais, GRATIDÃO a tudo e a todos. Que Deus multiplique, na vida de vocês, o bem que a mim fizeram e fazem. Muito obrigada!

“Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários.” (Santa Paulina).

RESUMO

Introdução: A anexina A1 (AnxA1) apresenta potencial benefício para o tratamento da dor e da inflamação, pois a ativação de seu receptor (FPR2/ALX) exerce efeitos anti-inflamatórios, pró-resolutivos e medeia a ação dos glicocorticoides (GCs), os quais são liberados com a prática de exercício físico, por ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA). **Objetivo:** O presente estudo avaliou o envolvimento da via AnxA1-FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico da natação em um modelo não clínico de dor pós-operatória. **Métodos:** Do tipo não clínico, este estudo utilizou camundongos Swiss machos (35-45g), mantidos no Laboratório de Neurociências Experimental (LANEX) da UNISUL, em condições padronizadas de ambientação em biotério, de acordo com as diretrizes ARRIVE. A dor pós-operatória foi induzida por uma incisão plantar (pele e fáscia) e, nos diferentes experimentos, foram utilizados 152 camundongos, alocados em grupos de animais (n=8) não exercitados e exercitados. Os animais exercitados foram submetidos a cinco dias de natação, contínua ou intervalada e avaliado os efeitos sobre a hiperalgesia mecânica, o edema e a temperatura da pata, a concentração de citocinas inflamatórias e o imunoconteúdo de AnxA1, FPR2/ALX e marcadores de macrófagos M1 e M2. Para verificar o envolvimento do receptor FPR2/ALX, foi utilizado o antagonista WRW4 em sítio periférico e central, previamente à natação. **Resultados:** A natação, contínua e intervalada, apresentou efeito anti-hiperalgésico e antiedematoso; o WRW4 preveniu a redução da hiperalgesia causada pelos protocolos de exercício; a natação aumentou o imunoconteúdo de AnxA1, diminuiu FPR2/ALX, aumentou as concentrações de IL-1 β , IL-6 e IL-10 e reduziu IL-4. Somente a natação contínua reduziu o imunoconteúdo de CD86 e aumentou NOS-2 e arginase-1. **Conclusão:** A natação, contínua e intervalada, induz efeito anti-hiperalgésico no modelo animal de dor pós-operatória possivelmente pela ativação do receptor FPR2/ALX. Além disso, o exercício apresentou efeito anti-inflamatório, por reduzir o edema e aumentar a concentração de IL-10. Esses resultados fornecem subsídios para o entendimento do mecanismo de ação da terapia e, assim, contribuem para o manejo adequado da dor inflamatória.

Descritores: Dor pós-operatória. Natação. Treinamento intervalado de alta intensidade. Anexina A1.

ABSTRACT

Introduction: Annexin A1 (AnxA1) has potential benefit for the treatment of pain and inflammation, as the activation of its receptor (FPR2/ALX) exerts anti-inflammatory, pro-resolving effects and mediates the action of glucocorticoids (GCs), which are released with the practice of physical exercise, by activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Objective:** The present study evaluated the involvement of the ANXA1-FPR2/ALX pathway in the antihyperalgesic effect of swimming in a non-clinical model of postoperative pain. **Methods:** Of the non-clinical type, this study used male Swiss mice (35-45g), kept at the Laboratory of Experimental Neurosciences (LANEX) at UNISUL, under standardized conditions of setting in a bioterium, in accordance with ARRIVE guidelines. Postoperative pain was induced by a plantar incision (skin and fascia), and in the different experiments, 152 mice were used, allocated in groups of animals (n=8) not exercised and exercised. The exercised animals were submitted to five days of swimming, continuous or with intervals, and the effects on mechanical hyperalgesia, edema and paw temperature, concentration of inflammatory cytokines and immunocontent of AnxA1, FPR2/ALX and macrophage markers M1 and M2 were evaluated. To verify the involvement of the FPR2/ALX receptors, the antagonist WRW4 was used in peripheral and central sites, prior to swimming. **Results:** Swimming, continuous and intervals, had an anti-hyperalgesic and anti-edematous effect; WRW4 prevented anti-hyperalgesia caused by swimming protocols; Swimming increased the immunocontent of AnxA1; decreased FPR2/ALX; increased IL-1 β , IL-6 and IL-10; reduced IL-4; and only continuous swimming reduced CD86 and increased NOS-2 and arginase-1. **Conclusion:** Swimming, continuous and interval, induces an antihyperalgesic effect in the animal model of postoperative pain, possibly by activating the FPR2/ALX receptor. In addition, exercise had an anti-inflammatory effect, as it reduces edema and increases the concentration of IL-10. These results provide support for understanding the mechanism of action of the therapy, and thus contribute to the proper management of inflammatory pain.

Keywords: Pain postoperative; Swimming; High-Intensity Interval Training; Annexin A1.

LISTAS

Lista de abreviaturas

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico (do inglês, *adrenocorticotropic hormone*)

AMPA – Receptor de glutamato do tipo AMPA (do inglês, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)

ANOVA – Análise de Variância

AnxA1 – Anexina A1

AP-1 – Proteína ativadora 1 (do inglês, *activator protein 1*)

CD206 – Marcador imunológico M2 (do inglês, *cluster of differentiation 206*)

CD86 – Marcador imunológico M1 (do inglês, *cluster of differentiation 86*)

COX-2 – Cicloxigenase 2

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina (do inglês, *corticotrophin releasing hormone*)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

FPR – Receptor para peptídeos formilados (do inglês, *formyl peptide receptors*)

GC – Glicocorticoide

HIIT – Treinamento intervalado de alta intensidade (do inglês, *high intensity interval training*)

HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal (do inglês, *hypothalamo-pituitary-adrenocortical*)

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

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase (do inglês, *nitric oxide synthase*)

i.pl. – Intraplantar

i.t. – Intratecal

LaNEx – Laboratório de Neurociências Experimental

LT – Leucotrieno

LX – Lipoxina

M1 – Macrófago pró-inflamatório

M2 – Macrófago anti-inflamatório

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

MIA – Morte Indolor Assistida
 NF- κ B – Fator nuclear kappa B (do inglês, *nuclear factor kappa B*)
 NMDA – Receptor de glutamato do tipo NMDA (do inglês, *N-methyl-D-aspartate*)
 PG – Prostaglandina
 PLA₂ – Fosfolipase A₂ (do inglês, *phospholipase A₂*)
 Rv – Resolvina
 SNC – Sistema Nervoso Central
 TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)
 UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
 UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina
 WRW4 – Antagonista para o receptor FPR2/ALX (Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-NH₂)

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo.....	56
-------------------------------------	----

Lista de figuras

Figura 1 – Etapas do processamento da dor.....	19
Figura 2 – Migração celular para o sítio inflamatório.....	24
Figura 3 – Interação celular durante a resolução da inflamação.....	26
Figura 4 – Ilustração do decurso temporal da migração de leucócitos e da formação de mediadores lipídicos na resposta inflamatória.....	27
Figura 5 – Diferenças entre os termos anti-inflamatório e pró-resolutivo	29
Figura 6 – Diagrama esquemático do eixo HPA.....	30
Figura 7 – Efeitos dos glicocorticoides e da AnxA1 sobre os leucócitos durante a resposta inflamatória.....	32
Figura 8 – Representação esquemática das formas de mobilização de AnxA1 em células ativadas e formas de comunicação com outras células.....	33
Figura 9 – Mecanismos da AnxA1 por meio da interação com FPR2/ALX.....	37
Figura 10 – Fluxograma ilustrativo referente ao delineamento experimental...	48
Figura 11 – Desenho experimental.....	49
Figura 12 – Banheira para natação.....	51
Figura 13 – Teste de von Frey.....	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
1.1.1 Processamento da dor.....	18
1.1.1.1 Dor pós-operatória.....	20
1.1.2 Processo inflamatório.....	22
1.1.3 Resolução da inflamação e mediadores pró-resolutivos.....	25
1.1.3.1 AnxA1 como mediador anti-inflamatório e pró-resolutivo.....	29
1.1.3.2 Receptor FPR2/ALX.....	34
1.1.4 Exercício físico na dor e no processo inflamatório.....	37
2. OBJETIVOS.....	44
2.1 OBJETIVO GERAL.....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3. MÉTODOS.....	45
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	45
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	45
3.3 ANIMAIS.....	46
3.3.1 Critérios de exclusão.....	47
3.3.2 Cálculo amostral.....	47
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	48
3.4.1 Grupos experimentais.....	49
3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS.....	50
3.5.1 Modelo animal de dor pós-operatória.....	50
3.5.2 Protocolo de natação para camundongos.....	51
3.5.3 Testes comportamentais.....	52
3.5.3.1 Mensuração da hiperalgesia mecânica.....	52
3.5.3.2 Avaliação do edema da pata.....	53
3.5.3.3 Avaliação da temperatura da pata.....	53
3.5.4 Avaliação do envolvimento do receptor FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico da natação.....	54
3.5.5 Ensaios imunológicos.....	54

3.5.5.1 Preparação das amostras para <i>Western Blotting</i>	54
3.5.5.2 Separação de proteínas e imunodeteção.....	55
3.5.5.3 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	55
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	56
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	57
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	57
4. ARTIGO.....	58
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	82
ANEXO A – Parecer Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais..	82
ANEXO B – Produção científica publicada durante o período do Doutorado.....	90

1. INTRODUÇÃO

Dentre os sinais e sintomas cardinais da inflamação, destaca-se a dor, por ser debilitante, principal queixa e o motivo pelo qual as pessoas buscam atendimento médico, sendo por isso considerada como o quinto sinal vital, necessitando de um manejo adequado¹. Apesar de desagradável, a dor possibilita a detecção de estímulos nocivos, sendo um sistema de alerta essencial para a integridade e sobrevivência do organismo². Esse fenômeno pode ser observado após procedimentos cirúrgicos, uma vez que, mediante incisões teciduais, territórios protegidos pelo próprio organismo são invadidos e uma resposta inflamatória inicial é gerada³, havendo como consequência uma modulação de receptores sensoriais periféricos e centrais, reduzindo o limiar de excitação e predispondo à sensibilização central⁴.

Aproximadamente 10% dos pacientes submetidos a todas as cirurgias desenvolvem dor crônica, a qual inicia como dor aguda de difícil controle, mas logo se transforma em uma condição de dor persistente com características neuropáticas, não havendo clareza a respeito do mecanismo envolvido nesse fenômeno. Todavia, sabe-se que ocorre uma resposta inflamatória após a incisão cirúrgica gerando dor, que, quando não tratada adequadamente, pode se tornar crônica e incapacitante³. Globalmente, mais de 320 milhões de pessoas fazem cirurgias a cada ano, o que representa um amplo potencial para o desenvolvimento de dor pós-operatória, sendo esta reconhecida como um problema de saúde pública, devido ao sofrimento provocado e utilização de abordagens terapêuticas insatisfatórias no manejo da dor^{5,6}.

Especificamente após o organismo ser infectado ou lesionado, ocorre o desenvolvimento de um processo inflamatório que atua na sua defesa. Tal ação visa eliminar o estímulo agressor, promover reparo e cicatrizar o tecido⁷. Contudo, quando esse processo está desregulado, os sintomas permanecem e o quadro pode se tornar crônico, predispondo ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo artrite, aterosclerose, doenças autoimunes e câncer⁸.

É fato que, paralelamente à inflamação aguda, ocorre um processo ativo de resolução que se inicia nas primeiras horas após a infecção ou lesão tecidual e envolve a síntese de mediadores pró-resolutivos especializados, incluindo as lipoxinas (LXs), resolvinas (Rvs) e mediadores proteicos, como a proteína induzida por glicocorticoide (GC) – anexina A1 (AnxA1)^{9,10}. Alguns desses mediadores, como a AnxA1, reduzem

a dor inflamatória por meio da ativação do receptor para peptídeos formilados do tipo 2 (FPR2/ALX – do inglês, *formyl peptide receptors 2*)¹¹. A ativação desse receptor limita o recrutamento adicional de leucócitos, facilita a resolução da inflamação (por induzir apoptose dos neutrófilos), recruta monócitos e ativa macrófagos que, por sua vez, realizam a fagocitose dos neutrófilos apoptóticos, prevenindo a liberação de mais citocinas e quimiocinas⁹. Assim, uma melhor compreensão acerca de estratégias complementares que possam ativar a via AnxA1-FPR2/ALX pode acelerar e contribuir para a fase de resolução da inflamação^{12,13}.

No que diz respeito à dor e ao processo inflamatório, busca-se aperfeiçoar terapias que possam contribuir para a resolução da inflamação mediante ativação das vias relacionadas ou indução da biossíntese dos mediadores resolutivos especializados. Nesse contexto, uma abordagem terapêutica muito utilizada para o manejo da dor é o exercício físico^{14,15}, haja vista que influencia no limiar nociceptivo, gera efeito analgésico^{16,17} e acelera os processos de reparo tecidual após a inflamação¹⁸.

Estudos epidemiológicos mostram que o exercício físico está entre os fatores mais importantes na regulação do sistema imunológico e na melhora da qualidade de vida^{19,20}, diminuindo o risco de desenvolvimento de múltiplas condições clínicas, incluindo doenças cardiovasculares, metabólicas e psíquicas^{21,22}. Na tentativa de entender melhor esses efeitos, pesquisas apontam que a prática regular de exercício físico induz uma adaptação fisiológica no organismo, por melhorar a frequência cardíaca em repouso, restabelecer o tônus vagal²³, regular o sistema imunológico e induzir mecanismos adaptativos metabólicos e epigenéticos, reduzindo a produção de fatores inflamatórios em monócitos, macrófagos²⁴ e no músculo esquelético^{25,26}.

Nessa perspectiva, já está bem estabelecido na literatura que o exercício físico apresenta efeito analgésico, por ativar diferentes sistemas endógenos de controle da dor, entre eles: sistema opioidérgico¹⁷, serotoninérgico¹⁷, adenosinérgico²⁷ e endocanaboidérgico²⁸, demonstrados por estudos pré-clínicos. Além disso, tem sido observado o efeito anti-inflamatório do exercício físico após um protocolo de corrida contínua e intervalada em esteira no modelo de dor pós-isquemia crônica²⁹, bem como efeito imunomodulador da natação de baixa e moderada intensidade em modelos animais de doenças respiratórias³⁰.

Em relação à síntese de mediadores pró-resolutivos, estudos clínicos demonstraram aumento nos níveis sanguíneos de LXs, RvE₁, RvD₁ e protectinas após

uma única sessão de exercício de resistência intenso³¹, bem como aumento significativo de LXA₄ imunorreativa na excreção urinária após exercício máximo em ciclo ergômetro³². Apesar dos relevantes achados, não há relatos na literatura de que esses mediadores pró-resolutivos possam mediar os efeitos analgésicos do exercício físico.

Além disso, o exercício físico, considerado um estressor fisiológico para o organismo, ativa o sistema nervoso simpático resultando na produção de epinefrina, bem como na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), resultando na produção de GCs, devido ao aumento da demanda energética para os tecidos somáticos. Nesse sentido, a epinefrina aumenta a produção celular de adenosina trifosfato e os GCs promovem a gliconeogênese no fígado³³⁻³⁵. Cabe destacar também que os GCs, primeira classe de mediadores anti-inflamatórios endógenos, têm sido usados com sucesso para fins terapêuticos, cuja liberação circadiana pelas glândulas adrenais facilita o controle da homeostase.

Dessa forma, durante a inflamação, níveis aumentados de cortisol minimizam o processo inflamatório local e sistêmico, favorecendo a resolução adequada desse processo³⁶. Então, conforme mencionado anteriormente, a AnxA1 é sintetizada a partir dos GCs e atua no processo de resolução da inflamação, surgindo como potencial alvo terapêutico. Entretanto, não há evidências científicas dos efeitos induzidos pelo exercício físico por meio desse mecanismo de ação.

Logo, associando as evidências de que o exercício físico apresenta efeito anti-hiperalgésico^{17,28,29}, ativa e regula o eixo HPA³³⁻³⁵, aumenta a síntese de mediadores pró-resolutivos, como LXs e Rvs^{31,32} e que não há relatos na literatura relacionando a ação desses mediadores na analgesia induzida pelo exercício físico ou a participação da AnxA1 no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, surge a seguinte pergunta: a via AnxA1-FPR2/ALX está envolvida no efeito anti-hiperalgésico da natação contínua e intervalada no modelo pré-clínico de dor pós-operatória?

O fato de que a AnxA1 é sintetizada a partir do GC, o qual é liberado durante o exercício físico, justifica a investigação do envolvimento da via AnxA1-FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico causado pela natação. Diante disso, o presente estudo visa investigar, por meio de testes comportamentais, farmacológicos e bioquímicos, o envolvimento da via AnxA1-FPR2/ALX sobre o efeito anti-hiperalgésico da natação contínua e intervalada, em um modelo animal de dor pós-operatória. Isso porque compreender o mecanismo neurofisiológico envolvido nos efeitos do exercício físico

proporcionará mais segurança na prescrição dessa modalidade, despertando possíveis adaptações e permitindo que novas abordagens sejam desenvolvidas a fim de controlar as condições dolorosas e inflamatórias.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Processamento da dor

A dor, considerada um sintoma clínico, é a principal queixa e o motivo pelo qual os indivíduos procuram auxílio médico. Com base nisso, passou a ser considerada o quinto sinal vital e deve ser tratada como tal, visando intervenção terapêutica adequada¹. Dessa forma, apesar de desagradável, a dor possibilita a detecção de estímulos nocivos, caracterizando-se, portanto, como um sistema de alerta essencial para a sobrevivência e integridade do organismo². Assim, de acordo com o conceito estabelecido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP – do inglês, *International Association for the Study of Pain*), trata-se de uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante ao dano tecidual real ou em potencial³⁷. Por isso, é considerada uma das modalidades sensoriais do corpo com maior grau de complexidade, envolvendo tanto aspectos neurais quanto emocionais, conhecidos como componentes fisiológicos e psicológicos da dor, respectivamente³⁸.

Com base nesse contexto, observa-se que a dor não é apenas o resultado de uma estimulação sensorial anormal, mas sim a combinação de reconhecer o desconforto e interpretar a resposta emocional desencadeada, sendo esta dependente da experiência prévia de cada indivíduo³⁹. No caso dos animais, o processamento da dor também envolve diferentes aspectos – neurais e psicológicos – todavia, pela ausência de comunicação verbal, há maior dificuldade de avaliar o componente emocional e/ou afetivo da dor nos animais⁴⁰. Por isso, utilizam-se testes espontâneos ou evocados, cuja finalidade é avaliar o comportamento e a expressão facial do animal ou a resposta de retirada após a aplicação de um estímulo nocivo⁴¹.

Os resultados obtidos na maioria dos testes nociceptivos demonstram menor variabilidade entre os avaliadores e, conseqüentemente, uma menor quantidade de animais é necessária, o que contribui para que a maioria dos estudos avaliem o componente neuronal da dor, fenômeno conhecido como nocicepção e que está relacionado à parte fisiológica da dor⁴² (Figura 1).

Nesse contexto, a nociceção se refere ao aspecto neuronal do processamento do estímulo nocivo e envolve etapas como a transdução, a condução da transmissão, a modulação e a percepção. A transdução é a conversão da energia gerada por um estímulo nocivo em potencial de ação pelos receptores sensoriais; a condução é a propagação do impulso elétrico do Sistema Nervoso Periférico até o Sistema Nervoso Central (SNC) por meio das fibras A δ e C; a transmissão ocorre no corno posterior da medula espinal por meio da liberação de neurotransmissores, principalmente glutamato; a modulação está relacionada aos impulsos descendentes inibitórios ou facilitadores que modulam a transmissão nociceptiva; e, por fim, a percepção é a assimilação dos sinais que chegam às estruturas superiores e são interpretados como dor³⁸ (Figura 1).

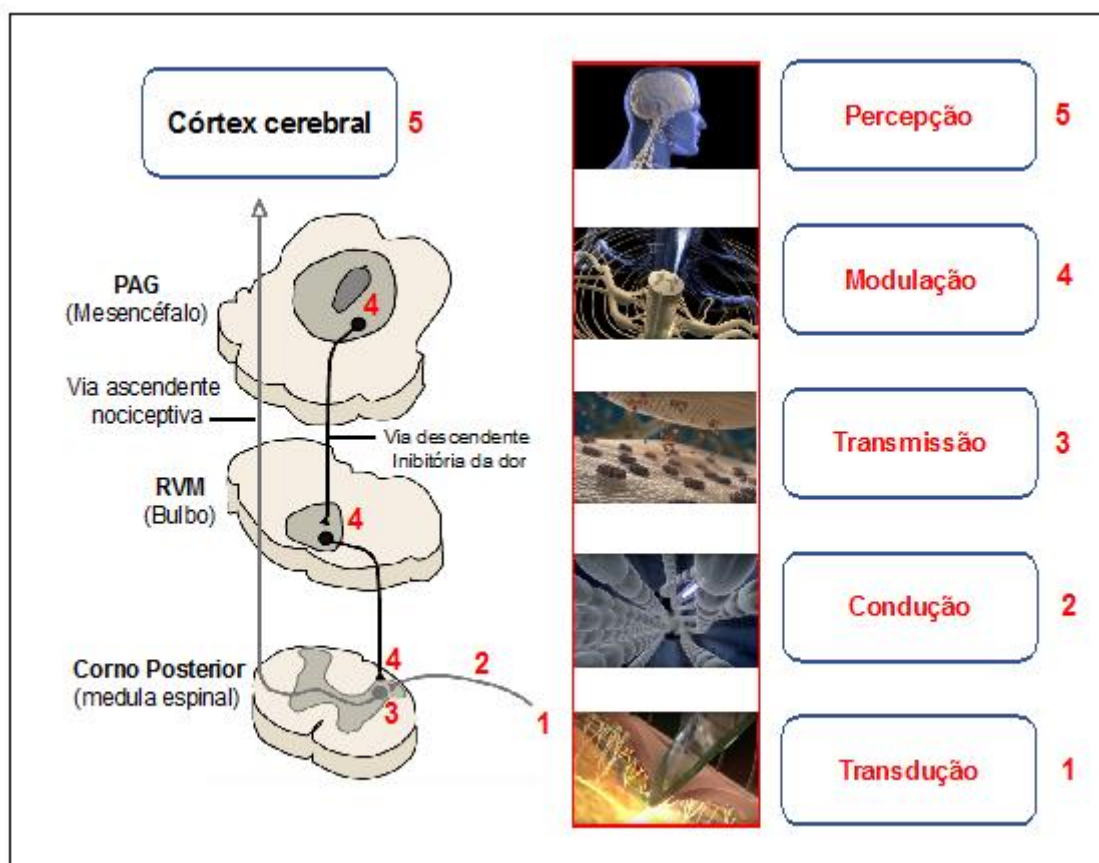


Figura 1 – Etapas do processamento da dor. Esse fenômeno é constituído por cinco diferentes fases: transdução, condução, transmissão, modulação e percepção. *RVM – bulbo rostral ventromedial (do inglês, *rostromedial medulla*); PAG – substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *periaqueductal gray*).

Fonte: adaptada de Salgado (2019)⁴³.

Com base no modelo biopsicossocial da dor, há cinco categorias para o seu mecanismo: 1) dor nociceptiva – ocorre devido à ativação do nociceptor e, embora

processada por meio do SNC, tipicamente resulta em dor localizada aguda, tal como após um procedimento cirúrgico; 2) dor nociplástica – resulta da mudança no processamento nociceptivo, geralmente no SNC, como aumento da excitabilidade central ou diminuição da inibição central, muitas vezes referida como sensibilização central, como, por exemplo, a dor decorrente da fibromialgia; 3) dor neuropática – devido a uma lesão ou doença no sistema somatossensorial, tal como uma lesão direta do nervo ou devido a doenças metabólicas, como diabetes; 4) psicológica – relacionada a fatores psicológicos relevantes para a dor; e 5) disfunção do sistema de movimento^{44,45}.

Esse novo conceito desperta uma nova maneira de abordagem baseada em mecanismos para o tratamento adequado da dor⁴⁵. Por isso, profissionais de saúde deverão conhecer tanto o mecanismo fisiopatológico da dor quanto os possíveis mecanismos de ação da técnica a ser empregada, seja ela farmacológica ou uma terapia complementar alternativa.

1.1.1.1 Dor pós-operatória

Há relatos na literatura de que, mundialmente, mais de 230 milhões de pessoas são submetidas a cirurgias todos os anos. Dessas, 38% são procedimentos ortopédicos, sendo estes considerados os mais dolorosos no período pós-operatório⁴⁶. Tais procedimentos cirúrgicos, mediante incisões teciduais, invadem territórios protegidos pelo próprio organismo e, com isso, modulam receptores sensoriais periféricos e centrais, reduzindo o limiar de excitação e predispondo à sensibilização central. Esse processo é identificado pelo encéfalo como dor inflamatória e somente será minimizado após haver regressão da ferida operatória e cicatrização. Dessa forma, estímulos nociceptivos desencadeados após a lesão tecidual pelo procedimento cirúrgico provocam sensibilização das vias centrais e periféricas de transmissão da dor, iniciando alterações somatossensoriais com aumento das respostas neuronais. Consequentemente, a dor se amplificará, reduzindo o limiar de excitação dos neurônios⁴.

Normalmente, há dor no pós-operatório, a qual deve ser atenuada precocemente a fim de reduzir o sofrimento alheio, promover a cicatrização e reabilitação, bem como diminuir as complicações pós-cirúrgicas. Todavia, observa-se que o manejo desse tipo de dor não tem sido bem-sucedido, apesar do aumento das

evidências nessa área^{46,47}, conseqüentemente, muitos indivíduos sofrem com dor pós-operatória grave após procedimentos cirúrgicos, enquanto outros desenvolvem dor crônica, resultante de uma condição clínica tratada de forma inadequada^{48,49}. Assim, pode haver efeitos adversos no período pós-cirúrgico, incluindo limitação da amplitude de movimento, diminuição da força e perda funcional, o que favorece o interesse em promover analgesia pós-operatória⁵⁰.

Em relação aos agentes terapêuticos utilizados no tratamento da dor, citam-se os anti-inflamatórios e os analgésicos opioides, contudo, eles apresentam efeitos colaterais, como lesões gastrointestinais e comprometimento hepático, além de, no caso dos opioides, causarem tolerância e dependência⁵¹. Por esse motivo, é necessário obter novos resultados sobre os mecanismos da dor pós-operatória em ambientes experimentais e clínicos a fim de desenvolver opções terapêuticas mais eficazes e com menor risco de gerar efeitos adversos⁴⁶.

A partir de estudos experimentais, sugere-se que o mecanismo envolvido na dor pós-operatória difere daqueles observados na dor nociceptiva de origem inflamatória e neuropática, visto que o processo de sensibilização envolve a ativação de receptores não NMDA (do inglês, *N-methyl-D-aspartate*), por exemplo, AMPA (do inglês, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)^{46,52}. Além disso, a fosforilação da subunidade GluR1 do receptor AMPA via fosfocinase C gama leva ao aumento da expressão de receptores AMPA na membrana plasmática neuronal, desempenhando papel importante na dor incisional⁵³.

Nessa perspectiva, a dor incisional é um dos modelos mais comuns de dor aguda em animais, por ser reprodutível, quantificável e – principalmente – por mimetizar uma condição clínica⁵⁴. Inicialmente, esse modelo de cissura plantar foi desenvolvido em ratos por Brennan e colaboradores (1996)⁵⁵ e consiste em uma incisão longitudinal de 1 cm, realizada na pele, fáscia e músculo plantar da pata traseira do rato, sob anestesia geral. Em seguida, a pele é suturada e, a partir de 1 h, o comportamento de dor é observado. Em 2003, esse modelo foi adaptado para camundongos, havendo pequenas modificações, principalmente no que diz respeito à incisão plantar realizada (incisão longitudinal de 5 mm com um único ponto de sutura), havendo resultados semelhantes na hiperalgesia mecânica e térmica quando comparado ao modelo induzido em ratos⁵⁴.

Recentemente, foram investigadas as células inflamatórias envolvidas nesse modelo de lesão por incisão em animais. Verificou-se que a migração de neutrófilos

para tecidos danificados pelo corte ocorre logo após a cirurgia, atingindo um pico no prazo de 24 h, seguido por um declínio rápido nos valores basais no terceiro dia^{56,57}. Essa infiltração de neutrófilos libera mediadores pró-inflamatórios conhecidos, como a interleucina-1 β (IL-1 β) e C5a, que podem desempenhar um papel na hiperalgesia após a incisão^{56,58}.

Nesse cenário, os padrões de comportamento doloroso após incisões cirúrgicas em roedores indicam que ocorre sensibilização periférica e central, sendo demonstrado que há uma hiperalgesia na região da incisão, mediada pela sensibilização de fibras aferentes primárias (A δ e C) e pela ativação de nociceptores silenciosos após a incisão. Assim, após a cissura plantar, as fibras C e A δ periféricas são sensibilizadas, contribuindo para a dor não evocada e a hiperalgesia mecânica e térmica nos primeiros dias^{54,59}. Nesse processo, ocorre diminuição no pH (pH: 6,8) e aumento da concentração de lactato (6 mM) que se correlaciona com o comportamento de dor após a incisão (1 a 2 dias). Associada a esse processo, ocorre também uma diminuição de oxigênio no local, contribuindo para a sensibilização periférica e o comportamento de dor após a incisão⁶⁰.

Então, após a incisão plantar (4 h), os animais exibem comportamento de dor não evocada (“guarda” do membro), o qual se resolve no prazo de 3 a 4 dias, sendo esse comportamento correlacionado à dor em repouso observada em humanos após a cirurgia. Da mesma forma, a hiperalgesia mecânica primária está presente no início (2 h após a incisão) e geralmente se resolve dentro de 5 a 6 dias após a incisão, caracterizando-se como um modelo de inflamação aguda autolimitada. Além disso, a cissura da pele sem a lesão muscular é suficiente para a indução da hiperalgesia mecânica após a incisão, demonstrando que a lesão muscular não é necessária para esse fim^{61,62}.

1.1.2 Processo inflamatório

A inflamação é parte de um benéfico sistema de defesa que foi aperfeiçoado e conservado evolutivamente ao longo de milhões de anos⁶³, sendo caracterizada como uma resposta às alterações induzidas por patógenos ou lesões de origem física ou química, cuja função consiste em eliminar o agente agressor e restaurar a homeostase do tecido afetado⁶⁴. Dessa forma, a inflamação desempenha importante papel na

defesa do organismo, mas, se não controlada, torna-se deletéria ao hospedeiro, progredindo para uma inflamação crônica, cicatrização e fibrose⁶⁵.

Todo esse processo inflamatório tem sido reconhecido e mencionado desde a Antiguidade, em que Celsus, no primeiro século antes de Cristo, descreveu os sinais e sintomas cardinais da inflamação, sugerindo que a resposta tecidual a uma lesão desencadeava rubor (vermelhidão devido à hiperemia), tumor (edema causado pelo aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de proteína para o espaço intersticial), calor (aumento da temperatura local associado ao aumento do fluxo sanguíneo e da atividade metabólica dos mediadores inflamatórios) e dor (devido às alterações perivasculares associadas às terminações nervosas livres)⁶⁶. Somente em 1871, Rudolf Virchow acrescentou a perda da função (disfunção dos órgãos envolvidos) como o quinto sinal cardinal da inflamação⁶⁷.

Importa ressaltar que, durante a fase aguda da inflamação, plaquetas, basófilos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos são ativados, produzindo e liberando mediadores solúveis que estimulam e regulam toda a resposta inflamatória (Figura 2). Dentre essa variedade celular, destacam-se os neutrófilos, pois são considerados os mediadores primários da resposta aguda, cuja função é destruir e digerir organismos estranhos após a fagocitose, mas que também podem liberar seu conteúdo interno e, assim, danificar os tecidos do hospedeiro no local da inflamação. Essas células migram do sangue para o local lesionado por meio da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular após degranulação de mastócitos ou basófilos, ativação do sistema complemento ou liberação de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs)⁸.

Nessa resposta vascular aguda também há secreção do fator de ativação plaquetária que auxilia no processo de permeabilidade e estimula as plaquetas a liberarem mediadores inflamatórios, resultando na ativação dos neutrófilos (Figura 2). Além disso, as plaquetas promovem a liberação de espécies reativas de oxigênio que podem contribuir para o dano tecidual e a produção de mediadores, tais como heparina e serotonina, promovendo o estado vasodilatador da resposta vascular aguda⁸.

Em relação aos mediadores solúveis da resposta inflamatória, destacam-se as citocinas, moléculas mensageiras que coordenam a comunicação celular e são secretadas principalmente por células fagocitárias, *natural killer*, as quais apresentam antígenos e linfócitos. Ademais, as citocinas contribuem para a inflamação por facilitar a quimiotaxia dos leucócitos para o local lesionado, por modular a função das células

imunes e estimular a proliferação e a diferenciação celular (Figura 2). Dentre as citocinas atuantes na perpetuação da resposta inflamatória, destacam-se IL-6, IL-1, Fator de Necrose Tumoral (TNF – do inglês, *tumor necrosis factor*) e interferon- γ ^{8,68}.

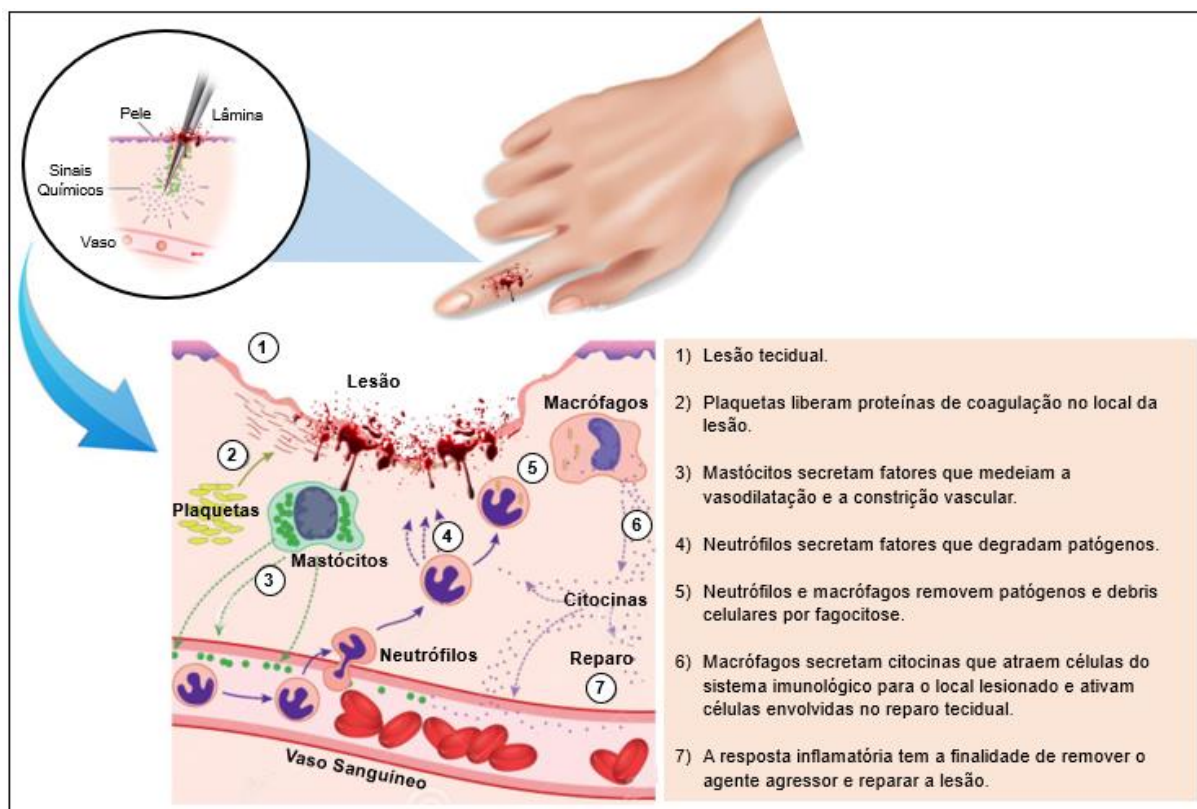


Figura 2 – Migração celular para o sítio inflamatório. Imagem ilustrativa do processo inflamatório, representando a migração de células de defesa para o local da lesão.

Fonte: adaptada de Dreamstime (2021)⁶⁹.

É possível verificar que a IL-6 medeia a fase inicial da resposta inflamatória e promove maior sobrevivência de linfócitos e macrófagos, enquanto a família das IL-1 apresenta efeito pró-inflamatório, pois estimula a produção de outras citocinas e favorece a liberação de PGs. Destaca-se que a IL-1 β é o principal membro dessa família e desempenha importante papel na regulação da resposta inflamatória, aumentando a expressão gênica, secreção das enzimas induzíveis, óxido nítrico sintase (iNOS – do inglês, *nitric oxide synthase*) e cicloxigenase 2 (COX-2), favorecendo a produção de outros mediadores inflamatórios, tais como: PGE₂, fator de ativação plaquetária e óxido nítrico. Além disso, a IL-1 β induz a expressão de moléculas de adesão, facilitando o recrutamento de células inflamatórias.

Outra citocina relacionada à resposta imune inata é o TNF, molécula atuante na inflamação que induz a produção de citocinas e moléculas de adesão celular, bem

como estimula a proliferação e o crescimento das células. Por outro lado, atua também na remoção de células mortas e na promoção da apoptose. Já o interferon- γ é um potente ativador de macrófagos, estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF) e é necessário para a transmigração de células inflamatórias do vaso sanguíneo para o local da lesão^{8,68}.

Destarte, todo esse processo inicial visa remover o agente agressor, porém, a ativação do sistema complemento desencadeia a formação de outros mediadores inflamatórios, como a bradicinina (que contribui para o aumento da sensibilidade neuronal a estímulos), os quais normalmente produziram pouca ou nenhuma dor. Esse fenômeno é denominado alodinia e é característico da dor inflamatória⁷⁰. Em contrapartida, quando um estímulo que geralmente causa dor torna-se capaz de gerá-la com uma intensidade muito maior do que o normal, recebe a denominação hiperalgesia¹⁰. Diante do exposto, observa-se que a resposta inflamatória é complexa e responsável por defender o organismo contra quaisquer tipos de lesões, porém, quando esse mecanismo está desregulado, a inflamação pode se tornar crônica, predispondo ao desenvolvimento de várias doenças⁷⁰.

1.1.3 Resolução da inflamação e mediadores pró-resolutivos

Na resposta inflamatória aguda, os neutrófilos são algumas das primeiras células relacionadas, haja vista serem os primeiros a migrar para o tecido-alvo em resposta a um estímulo nocivo. Consequentemente, desempenham importante papel na resposta inicial de defesa do hospedeiro, bem como contribuem para o processo ativo de resolução da inflamação, com o intuito de limpar debris celulares e, com isso, restaurar a arquitetura funcional e promover o reparo e a regeneração tecidual⁷¹ (Figura 3).

Como mencionado anteriormente, a inflamação é um processo complexo, que envolve a detecção de um estímulo nocivo pelas células do sistema imune inato residentes no tecido, atraindo neutrófilos circulantes a migrarem para o tecido inflamado a partir da produção de substâncias quimiotáticas. Estes, uma vez no tecido lesionado, promovem o recrutamento de monócitos a partir do sangue, favorecendo o desenvolvimento de um ambiente pró-inflamatório apto a lidar com o agente agressor⁷² (Figura 3).

Sob condições normais, os neutrófilos sofrem apoptose após realizarem sua ação local⁷³ e, em seguida, os macrófagos fagocitam esses neutrófilos apoptóticos, cujo processo recebe o nome de eferocitose. Por intermédio da eferocitose ocorre uma alteração no fenótipo dos macrófagos partindo do perfil pró-inflamatório (M1) para um perfil anti-inflamatório (M2), liberando mediadores que previnem a ruptura da membrana dos neutrófilos, minimizam respostas imunes e facilitam a saída dos macrófagos do sítio lesionado para os vasos linfáticos, favorecendo o retorno à homeostase tecidual⁷⁴ (Figura 3).

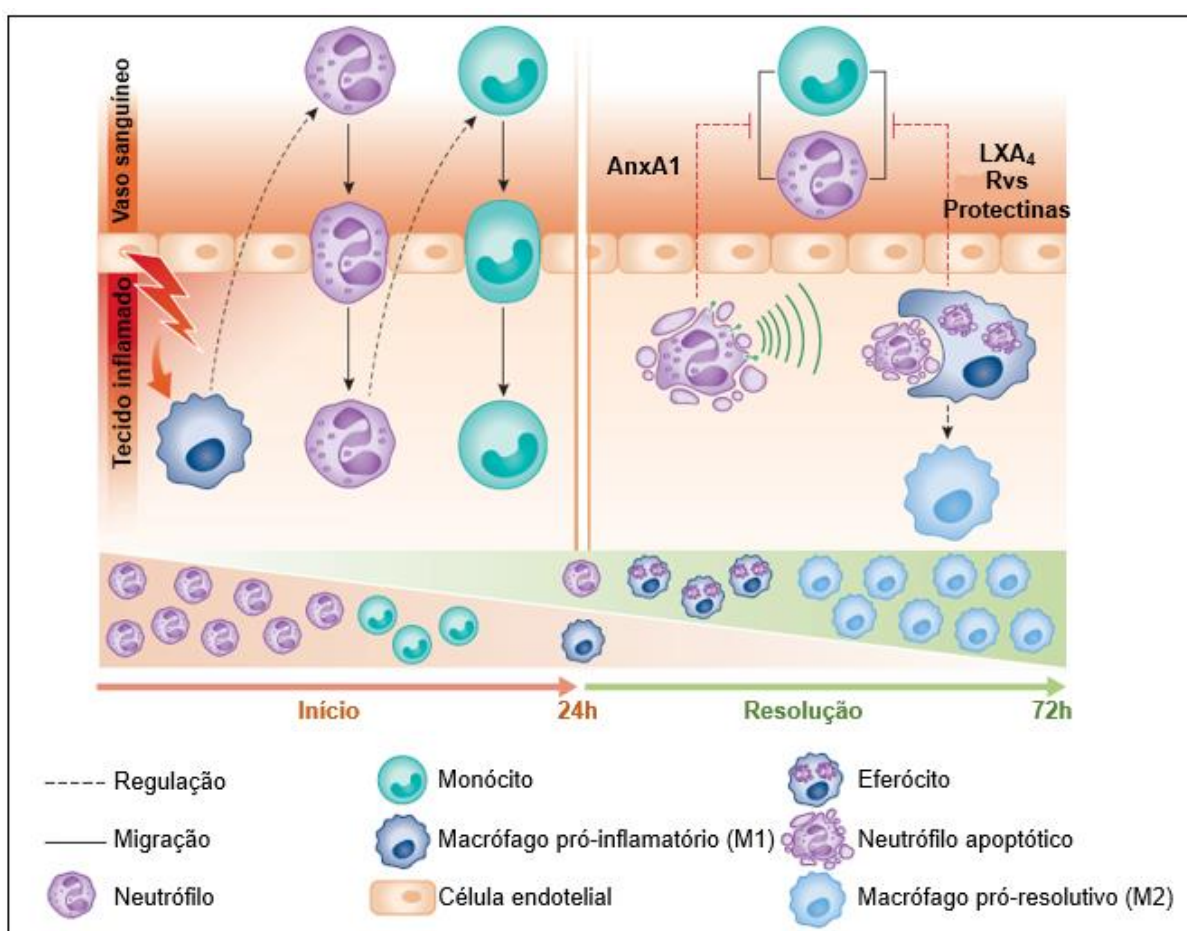


Figura 3 – Interação celular durante a resolução da inflamação. Durante as fases iniciais da inflamação, as células residentes nos tecidos detectam danos e iniciam a liberação de sinais que induzem a migração de neutrófilos. A resolução é iniciada quando os neutrófilos se tornam apoptóticos, secretando mediadores que inibem a infiltração contínua de neutrófilos. A eferocitose de neutrófilos apoptóticos altera o fenótipo dos macrófagos para um fenótipo pró-resolutivo (M2) e promove o retorno à homeostase tecidual.

Fonte: adaptada de Ortega-Gómez e colaboradores (2013)⁷⁴.

A fase de resolução da inflamação é caracterizada por eventos moleculares e celulares ativos e controlados biologicamente^{9,74}. Sendo assim, em uma resposta inflamatória autolimitada, há limpeza de debris celulares e remoção do agente

agressor por células imunes fagocitárias, seguida por uma resolução bem-sucedida dos infiltrados inflamatórios, envolvendo limpeza de leucócitos, reparo celular e restauração tecidual^{9,10,75}.

Nessa mesma perspectiva, estudos envolvendo a resolução da inflamação possibilitaram identificar uma nova classe de mediadores lipídicos especializados, com propriedade anti-inflamatória, conhecidos como mediadores pró-resolutivos, que incluem as LXs, as Rvs, as protectinas e as maresinas^{76,77}. Sabe-se que a eferocitose dos neutrófilos apoptóticos promovida pelos macrófagos desencadeia um aumento na produção desses mediadores lipídicos especializados que ocorre paralelamente à produção de PGE₂. Juntos, esses mediadores solúveis desempenham importante papel na resolução da inflamação^{77,78} (Figura 4).

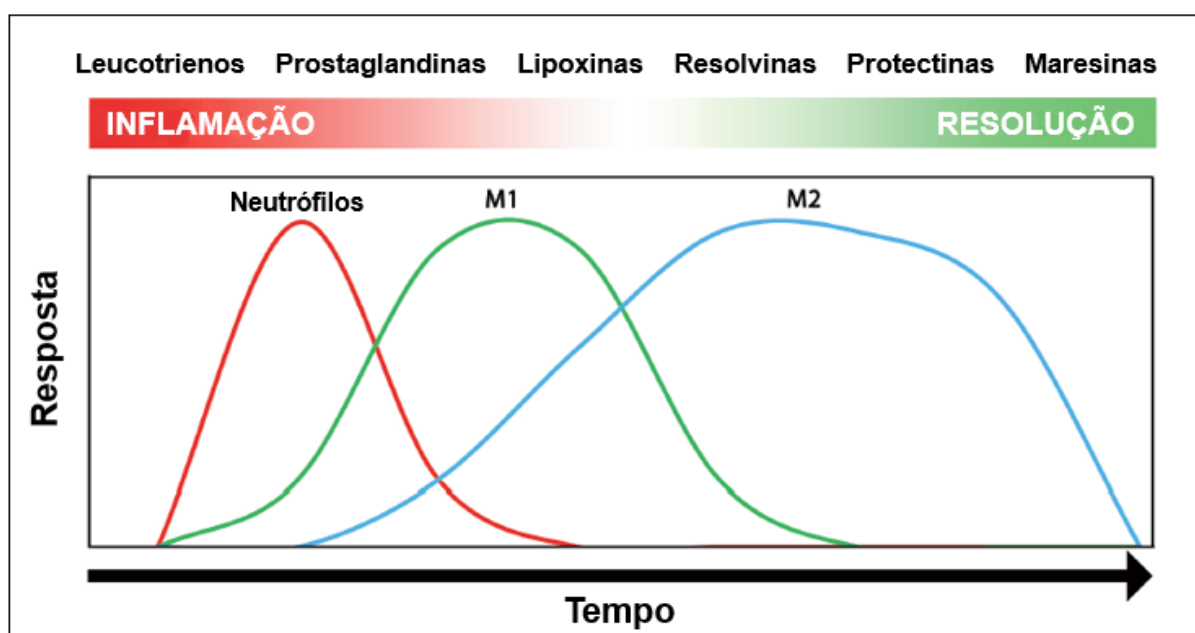


Figura 4 – Ilustração do decurso temporal da migração de leucócitos e da formação de mediadores lipídicos na resposta inflamatória. Logo após a lesão tecidual, os neutrófilos são mobilizados rapidamente e migram para o tecido lesionado em consequência da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular provocada por mediadores lipídicos pró-inflamatórios (LTs e PGs). Na fase seguinte da resposta inflamatória, ocorre uma troca na biossíntese desses mediadores, produzindo metabólitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos (LXs, Rvs, protectinas e maresinas) com a função de limitar a migração de neutrófilos e recrutar monócitos/macrófagos, com predominância do fenótipo M1 (pró-inflamatório). Na fase mais tardia, ocorre a ativação do fenótipo M2 (anti-inflamatório e pró-resolutivo).

Fonte: adaptada de Markworth e colaboradores (2016)⁷⁵.

Pode-se afirmar ainda que os mediadores lipídicos pró-inflamatórios atuam no recrutamento inicial de leucócitos por alterar o fluxo sanguíneo, favorecer a formação de edema e, conseqüentemente, a diapedese dos neutrófilos⁷⁹. Como resultado, as

PGs envolvidas nessa fase inicial da inflamação ativam a tradução de RNAm que codificam enzimas necessárias para a produção de mediadores lipídicos com perfil pró-resolutivo, essenciais durante a fase de resolução⁸⁰.

Assim, todo esse processo de resolução da inflamação é iniciado por uma troca ativa do perfil desses mediadores dos tipos PGs e LTs para a produção dos metabólitos resolutivos, tais como LXs, Rvs, protectinas e maresinas, mencionados anteriormente (Figura 4). A síntese desses mediadores ocorre durante a fase de resolução da inflamação aguda, por vias complexas, logo, as LXs são derivadas de ácidos graxos endógenos (ácido araquidônico), enquanto as Rvs, protectinas e maresinas são derivadas de ácidos graxos da dieta, especificamente os ácidos graxos ω -3 encontrados também no óleo de peixe. Funcionalmente, esses mediadores lipídicos pró-resolutivos estimulam e aceleram a resolução da inflamação por mecanismos multifatoriais, em nível tecidual⁸¹.

Ademais, o conceito de que os processos de resolução não causam apenas o término da inflamação, mas também auxiliam na mudança da imunidade inata para a adaptativa, oferece oportunidade adicional ao tratamento de doenças inflamatórias ou persistentes a fim de promover a resolução. Portanto, tem sido particularmente importante dissociar o significado de “anti-inflamatório” do termo “pró-resolutivo”^{82,83} (Figura 5). Ressalta-se que, geralmente, as terapias anti-inflamatórias convencionais com o uso de anti-inflamatório não esteroide ou anti-TNF são baseadas na inibição de fatores que impulsionam a inflamação, agindo de forma contrária aos sinais pró-inflamatórios, minimizando essa resposta inicial.

Nesse sentido, essas intervenções anti-inflamatórias reduzem a inflamação desde o início, com ou sem resolução acelerada (Figura 5A). Em contrapartida, a ação pró-resolutiva melhora ou promove fatores essenciais para a remoção do estímulo desencadeante, bem como reduz a sinalização pró-inflamatória, seguida da limpeza de leucócitos. Dessa forma, terapias pró-resolutivas não afetam necessariamente o início da resposta inflamatória, mas aceleraram a fase de resolução (Figura 5B). De fato, a combinação do efeito pró-resolutivo com a tecnologia anti-inflamatória pode significar uma estratégia superior às abordagens atualmente existentes⁸⁴.

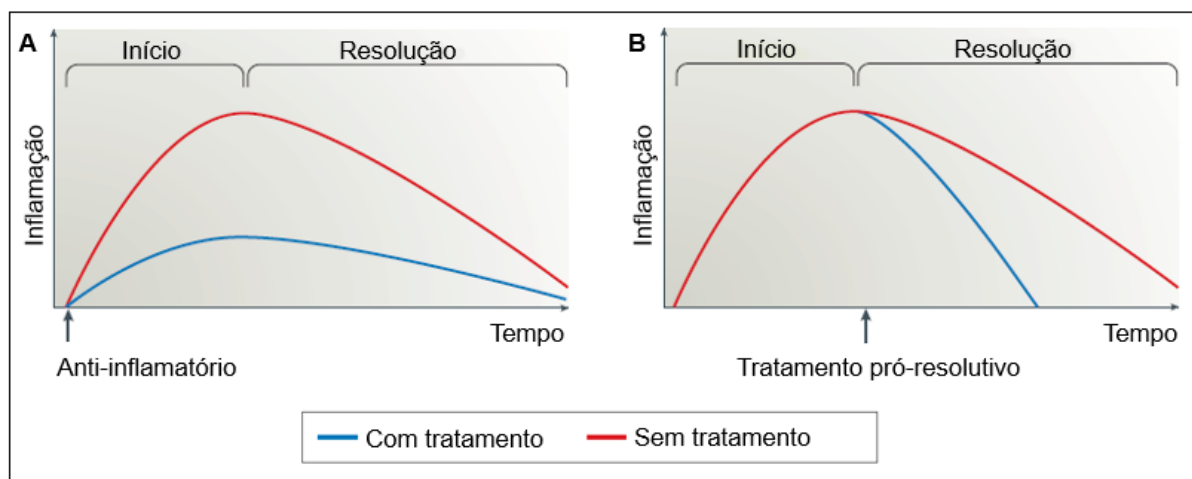


Figura 5 – Diferenças entre os termos anti-inflamatório e pró-resolutivo. Anti-inflamatório: substância que inibe fatores que impulsionam a inflamação, reduzindo-a desde o início, com ou sem resolução acelerada (painel A). Pró-resolutivo: substância que promove a remoção de leucócitos, reduz a sinalização pró-inflamatória e acelera o tempo de resolução (B).

Fonte: adaptada de Fullerton e Gilroy (2016)⁸⁴.

1.1.3.1 AnxA1 como mediador anti-inflamatório e pró-resolutivo

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA – do inglês, *hypothalamo-pituitary-adrenocortical*) representa um sistema de controle do organismo mediante condições de estresse, sendo considerado uma resposta hormonal primária ao desequilíbrio homeostático⁸⁵. Após a ativação do eixo HPA, ocorre a liberação de GCs endógenos na circulação sistêmica, cuja concentração é mantida dentro de limites fisiológicos, os quais se alteram de acordo com o ritmo circadiano ou em condições de estresse físico e emocional⁸⁶ (Figura 6).

Nesse panorama, a secreção do GC endógeno é regulada pelo sistema neuroendócrino e por mecanismos regulatórios locais renais, sendo o hormônio hipofisário, conhecido como adrenocorticotrófico (ACTH – do inglês, *adrenocorticotrophic hormone*), o principal fator que estimula a síntese e a liberação de corticosterona (em animais) ou cortisol (em humanos) na circulação sistêmica. Em contrapartida, a secreção de ACTH é regulada por dois hormônios neuropeptídicos hipotalâmicos, o fator liberador de corticotrofina (CRH – do inglês, *corticotrophin releasing hormone*) e a vasopressina.

A resposta do eixo HPA aos estímulos recebidos é atenuada pelos GCs endógenos que atuam na hipófise e no hipotálamo para suprimir a síntese e a liberação de ACTH, CRH e vasopressina e em outros locais para deprimir o impulso positivo ao hipotálamo (amígdala, tronco encefálico e hipocampo) (Figura 6). Todo

esse processo de regulação é importante, visto que a ativação inadequada ou prolongada do eixo HPA depende grande consumo energético e está relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças, tais como hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2 ou até mesmo imunossupressão⁸⁷.

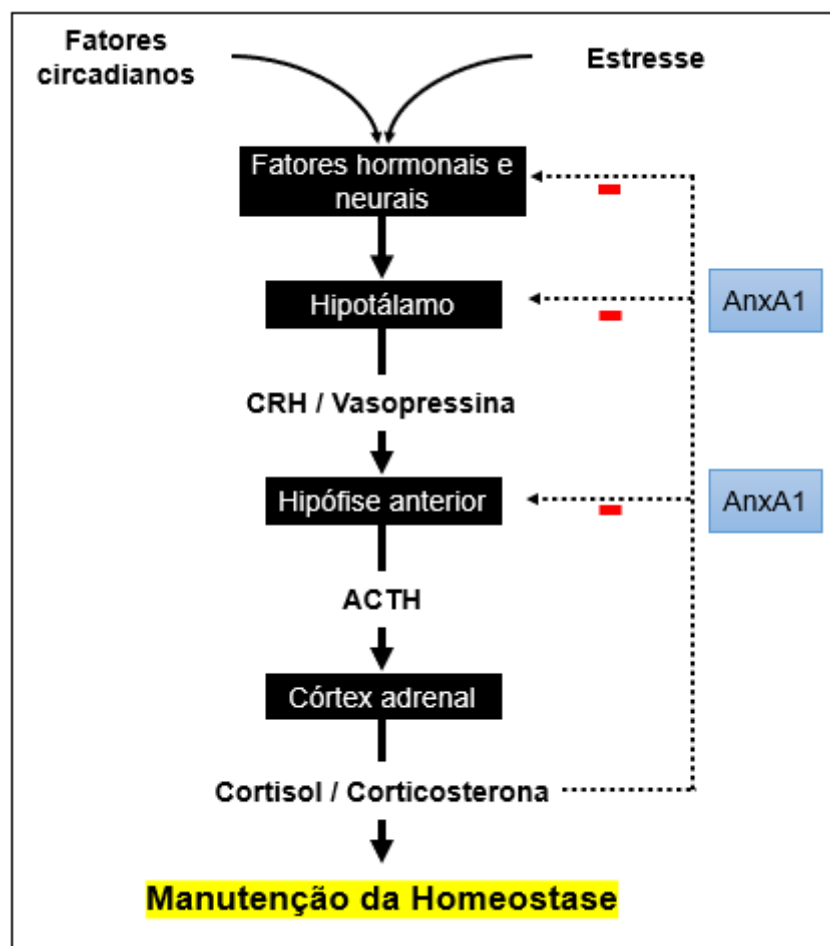


Figura 6 – Diagrama esquemático do eixo HPA. A ativação do eixo HPA resulta na síntese e liberação de GC endógeno na circulação sistêmica. O cortisol e a AnxA1 atuam como *feedback* negativo em diferentes níveis do SNC, inibindo a liberação de CRH, vasopressina e ACTH. *ACTH – hormônio adrenocorticotrófico (do inglês, *adrenocorticotropic hormone*); AnxA1: anexina A1; CRH – fator liberador de corticotrofina (do inglês, *corticotrophin releasing hormone*).

Fonte: adaptada de Buckingham e colaboradores (2003)⁸⁷.

Os GCs endógenos desempenham papel essencial na manutenção da homeostase e são protótipos para a classe de fármacos anti-inflamatórios esteroides utilizados com sucesso para fins terapêuticos⁸⁸. Durante a inflamação, os GCs endógenos são produzidos pelas glândulas suprarrenais, desempenhando papel fundamental na resolução da inflamação, no entanto, seus efeitos, tanto anti-inflamatórios quanto imunossupressores, dependem das vias de sinalização (transrepressão), tais como: fator nuclear kappa B (NF-κB – do inglês, *nuclear factor*

kappa B) e proteína ativadora 1 (AP-1 – do inglês, *activator protein 1*), bem como da indução gênica (transativação) de proteínas anti-inflamatórias⁸⁹.

Sobre esse assunto, é fundamental mencionar que a maioria dos efeitos anti-inflamatórios dos GCs são desencadeados por ação gênica e consequente regulação da síntese de proteínas. Sendo assim, a característica lipofílica dos GCs facilita sua passagem pela membrana plasmática da célula-alvo e, no citoplasma, liga-se ao seu receptor específico. Esse complexo GC-receptor se torna capaz de penetrar no núcleo celular, ligando-se a regiões promotoras da transcrição de genes, o que resulta na indução da síntese de proteínas anti-inflamatórias como a AnxA1 e IL-10⁹⁰.

Isso porque a proteína AnxA1 (37 KDa), também conhecida como lipocortina 1, é um dos membros de uma superfamília de proteínas (anexinas) que se ligam com alta afinidade a fosfolipídios de membrana na presença de Ca^{2+} . Existem 13 isoformas de anexinas em mamíferos, cada qual com funções específicas⁹¹, que atuam em comum na inibição da síntese de eicosanoides e LTs por meio da inibição da fosfolipase A_2 (PLA₂ – do inglês, *phospholipase A₂*), mimetizando as ações anti-inflamatórias dos GCs endógenos e exógenos⁹² (Figura 7). Dos 13 membros da família de anexinas, a AnxA1 se destaca devido ao seu potencial terapêutico na resposta inflamatória, pois inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, reduz o acúmulo de leucócitos, promove apoptose de neutrófilos, estimula a eferocitose e induz a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10^{93,94}.

Em relação à estrutura, a AnxA1 é uma proteína constituída por dois domínios, apresentando uma extremidade amino (N-terminal), com características variáveis em comprimento e composição, e por um domínio central na extremidade carboxílica (C-terminal), sendo esta uma região mais conservada entre os membros da família das anexinas⁹⁵. O domínio C-terminal é responsável pela afinidade da proteína ao Ca^{2+} e a região N-terminal pela ação anti-inflamatória da proteína⁹⁶. Por esse motivo, sua característica mais importante é a habilidade de alteração conformacional após ligação ao Ca^{2+} . Consequentemente, na ausência desse íon, a região N-terminal se dobra e permanece inacessível. Em contrapartida, na presença de Ca^{2+} , a AnxA1 altera sua forma, permitindo a ligação de fosfolipídios na região C-terminal com consequente exposição da região bioativa da proteína ao meio extracelular, ou seja, o domínio N-terminal⁹⁷.

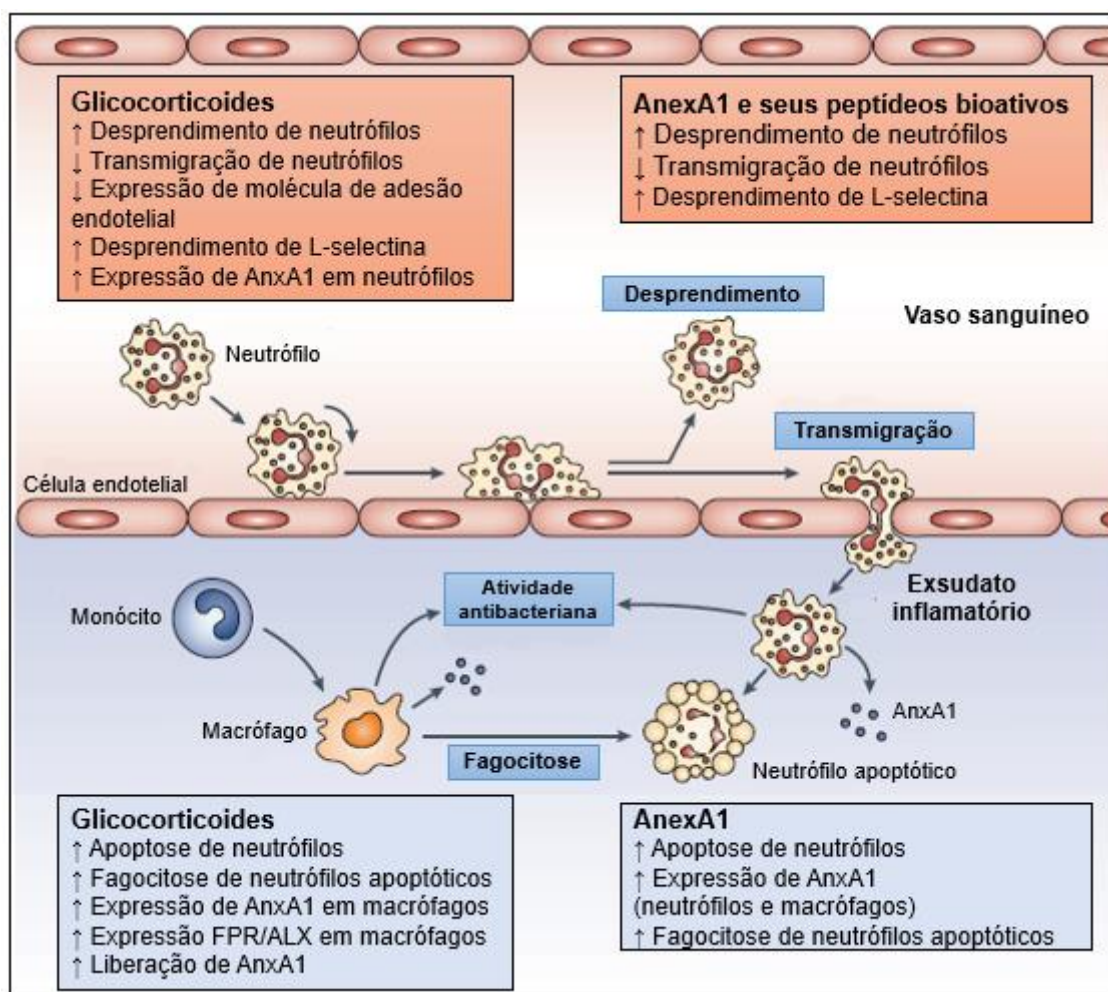


Figura 7 – Efeitos dos GCs e da AnxA1 sobre os leucócitos durante a resposta inflamatória. Várias funções desencadeadas pelos GCs são compartilhadas pela AnxA1, dentre as quais destacam-se a redução da transmigração de neutrófilos e o aumento da fagocitose de células apoptóticas. *AnxA1 – anexina A1; FPR2/ALX - receptor para peptídeos formilados do tipo 2 (do inglês, *formyl peptide receptors 2*).

Fonte: adaptada de Perretti e D'acquistio (2009)⁸⁸.

Ademais, a AnxA1 é expressa na hipófise, na área de eminência mediana do hipotálamo e, em menor quantidade, nos núcleos supraóptico e paraventricular. Na hipófise, a AnxA1 está localizada principalmente nas células folículo-estreladas não secretoras, particularmente nas projeções que se encontram em justaposição às células endócrinas. Já no hipotálamo, a AnxA1 é expressa principalmente nas células endimárias e endoteliais que revestem o terceiro ventrículo, assim como em células gliais ativadas (microglia e astrócitos)⁹⁸.

Também é importante destacar que a AnxA1 está presente nos fluidos biológicos, como o plasma, e em muitos tipos celulares, incluindo leucócitos, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e músculo esquelético^{88,93}. Em condições basais, os neutrófilos, monócitos e macrófagos contêm constitutivamente

altas concentrações de AnxA1 no citoplasma, sendo que, após a ativação celular, a AnxA1 é prontamente mobilizada para a superfície da célula e, em seguida, secretada⁹⁹. Os mecanismos moleculares responsáveis por essa rápida secreção são específicos de cada célula e incluem a ativação do transportador ABC, a fosforilação do resíduo de serina na porção N-terminal e o armazenamento em grânulos de gelatinase que posteriormente irão se fundir à membrana plasmática (Figura 8). Após ser liberada, a AnxA1 se liga à membrana plasmática de maneira dependente de Ca^{2+} , sofre mudança conformacional de sua estrutura, expondo a região N-terminal, o que favorece a ligação ao receptor FPR2/ALX. Essa sinalização ocorre por comunicação autócrina, parácrina ou justácrina, as quais parecem ser as formas mais plausíveis de ação para as condições inflamatórias⁸⁸.

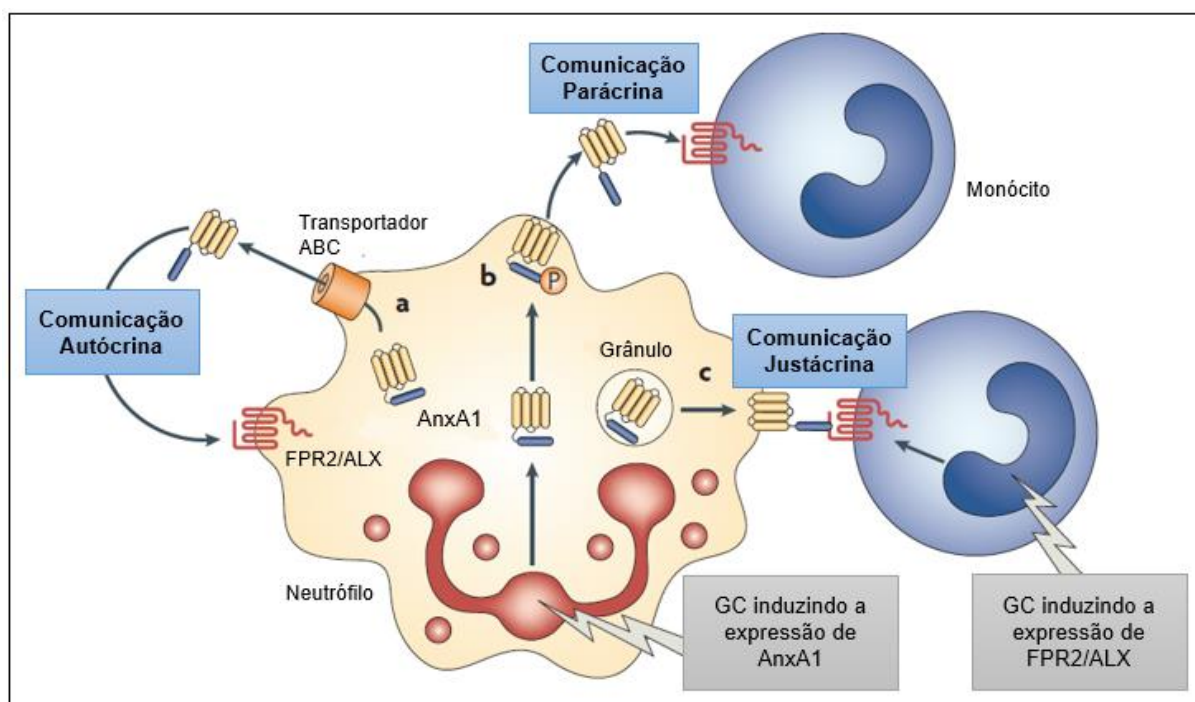


Figura 8 – Representação esquemática das formas de mobilização de AnxA1 em células ativadas e formas de comunicação com outras células. Após a ativação celular, a AnxA1 intracelular é mobilizada para a membrana plasmática e externalizada pelos seguintes mecanismos: ativação do transportador ABC (a); fosforilação do resíduo de serina (b) e fusão do grânulo com a membrana plasmática (c). *AnxA1: anexina A1; FPR2/ALX: receptor para peptídeos formilados do tipo 2 (do inglês, *formyl peptide receptors 2*); GC: glicocorticoide.

Fonte: adaptada de Perretti e D'acquistio (2009)⁸⁸.

Alguns estudos envolvendo modelos de inflamação aguda e crônica demonstraram que a proteína AnxA1 inibe o extravasamento de leucócitos do vaso para o local da inflamação^{88,100}. Por esse motivo, acredita-se que o mecanismo

responsável pelo efeito anti-inflamatório dessa proteína esteja inicialmente relacionado à inibição da transmigração dos leucócitos, mediante a inibição da atividade das moléculas de adesão, nas interações leucócito-endotélio, principalmente com as integrinas e selectinas^{88,101}. Sendo assim, a interação de neutrófilos com as células endoteliais, durante o estágio inicial da inflamação, promove o aumento da síntese e liberação de AnxA1, diminuindo consequentemente a adesão dos neutrófilos à parede microvascular, impedindo a transmigração exacerbada para o sítio inflamatório¹⁰². Esse dado é reforçado por estudos envolvendo camundongos *knockout* para AnxA1 que demonstraram maior extravasamento de neutrófilos em modelos animais de peritonite¹⁰³ e conjuntivite alérgica¹⁰⁴, quando comparados aos camundongos selvagens (AnxA1 +/+).

Além de afetar a migração de leucócitos, a AnxA1 também está envolvida na indução de apoptose desses neutrófilos, haja vista que, em um modelo de pleurisia aguda, o bloqueio da via da AnxA1 impediu a resolução da inflamação induzida pela dexametasona, abolindo eventos apoptóticos na cavidade pleural. Segundo McArthur e colaboradores (2015)¹⁰⁵, os neutrófilos apoptóticos são considerados o principal reservatório de AnxA1, atuando como importante agente para o recrutamento de monócitos e, assim, efetivando a segunda fase de resolução da inflamação aguda.

1.1.3.2 Receptor FPR2/ALX

Os FPRs pertencem à família de receptores acoplados à proteína G, funcionam como receptores de reconhecimento de padrão na defesa do hospedeiro durante a inflamação¹⁰⁶ e possuem três membros: FPR1, FPR2/ALX e FPR3. Nos seres humanos, esses três receptores atuam na regulação das respostas inflamatórias e são considerados a primeira linha de defesa contra a inflamação, por isso, suas funções têm sido investigadas no contexto de recrutamento e ativação de leucócitos, em que promovem motilidade celular por meio da quimiotaxia¹⁰⁷.

Em relação à localização desses receptores, FPR1 e FPR2/ALX são principalmente expressos em neutrófilos, monócitos e macrófagos, mas também estão presentes em células T, *natural killer*, células epiteliais, microvasculares e fibroblastos, enquanto o FPR3 está presente em monócitos, macrófagos e células dendríticas imaturas¹⁰⁶. Além disso, o FPR1 é expresso em astrócitos, células microgliais, hepatócitos e células dendríticas imaturas, enquanto o FPR2 apresenta uma

distribuição mais ampla, sendo expresso em uma variedade de células não mieloides, incluindo astrocitomas e neuroblastomas¹⁰⁸. Também foi demonstrada a presença dos três subtipos de receptores no hipocampo e hipotálamo de camundongos¹⁰⁹. Especificamente acerca do FPR2/ALX, uma análise com a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real demonstrou que, geralmente, o RNAm desse receptor está presente em todas as regiões do cérebro, com maior expressão no tronco cerebral e na medula espinhal¹¹⁰.

Embora haja semelhança na estrutura e nas funções desses receptores, eles diferem no reconhecimento e interação com o ligante¹⁰⁶. De maneira geral, os FPRs foram originalmente descobertos como receptores para proteínas e peptídeos contendo o grupamento N-formil metionina, contudo, sabe-se que esses receptores reconhecem uma variedade de ligantes estruturalmente diversos e que a sua função biológica ultrapassa o controle da transmigração dos leucócitos¹¹¹.

Além do mais, o FPR2/ALX é o receptor de ligação das LXs, e a interação destes impede a migração de neutrófilos, enquanto em monócitos a interação da LXA₄ ao receptor estimula a quimiotaxia de monócitos¹¹². Ainda importa destacar que o receptor FPR2/ALX pode reconhecer vários lipídeos, tais como análogos estáveis da LXA₄, 15-epi-LXA₄ desencadeada pela aspirina e RvD₁; proteínas e peptídeos, como a AnxA1; proteína amiloide sérica A e as derivadas de glicoproteínas virais; amiloide A β contendo 42 aminoácidos, dentre outros^{10,106,111}.

Assim sendo, a ligação de diferentes agonistas ao FPR2/ALX pode desencadear atividade biológica oposta, ou seja, enquanto a LXA₄, RvD₁ e a AnxA1 inibem a adesão de neutrófilos ao endotélio, a proteína amiloide sérica A promove a ativação dessas células e consequente acúmulo no tecido^{88,113}. Da mesma forma, no local lesionado, a sinalização via FPR visa regular a sobrevivência celular e a remoção de células inflamatórias infiltradas, porém, a proteína amiloide sérica A retarda esse processo, enquanto a AnxA1 acelera a apoptose dos neutrófilos, sendo esta uma etapa essencial para a fase inicial de resolução da inflamação¹¹⁴. Esses achados demonstram que, dependendo do ligante, as ações mediadas pelo receptor FPR2/ALX são duais, podendo, portanto, desempenhar um papel tanto pró-inflamatório quanto anti-inflamatório e resolutivo¹¹⁵.

Portanto, após a ligação aos seus agonistas, o FPR2/ALX sofre uma alteração conformacional, desencadeando a ativação de uma variedade de vias de sinalização, incluindo influxo de Ca²⁺ e ativação de PLA₂, C e D, fosfatidilinositol 3-quinase e

proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK – do inglês, *mitogen activated protein kinase*). Outro ponto de destaque é o local de interação do agonista com o receptor, pois, devido à estrutura da AnxA1 e ao fato de que, na presença de Ca^{2+} , sofre uma mudança conformacional com a exposição do seu domínio N-terminal, supõe-se que pelo menos dois locais nos FPR2/ALX são necessários para acomodá-la: o domínio N-terminal do FPR2/ALX, que é suficiente para induzir respostas rápidas; e a alça extracelular II, a fim de promover mudanças duradouras, tal como a modulação da expressão gênica¹¹.

Dessa forma, a AnxA1 é liberada por neutrófilos e macrófagos. Após a indução por GCs, interage com o FPR2/ALX e regula as vias de sinalização de cinases reguladas pelo sinal extracelular, ou MAPK, afetando a atividade dos fatores de transcrição para a AP-1, NF- κ B e fator nuclear de células T ativadas, regulando assim a atividade, proliferação e diferenciação de células T e exercendo efeitos anti-inflamatórios correspondentes, em contraste com os efeitos reguladores dos GCs nos receptores de células T (Figura 9)^{88,116}. Nesse sentido, a AnxA1 inibe a atividade da PLA₂, previne a formação de precursores inflamatórios do ácido araquidônico, induz a formação de fatores anti-inflamatórios, inibe a formação de COX-2, iNOS, a atividade e a migração de neutrófilos, bem como a síntese e liberação de fatores inflamatórios¹¹⁷. Além disso, a externalização da AnxA1 ativa um mecanismo de defesa promovendo a remoção de células apoptóticas e inibindo a secreção de fatores pró-inflamatórios por macrófagos (Figura 9)¹¹⁶.

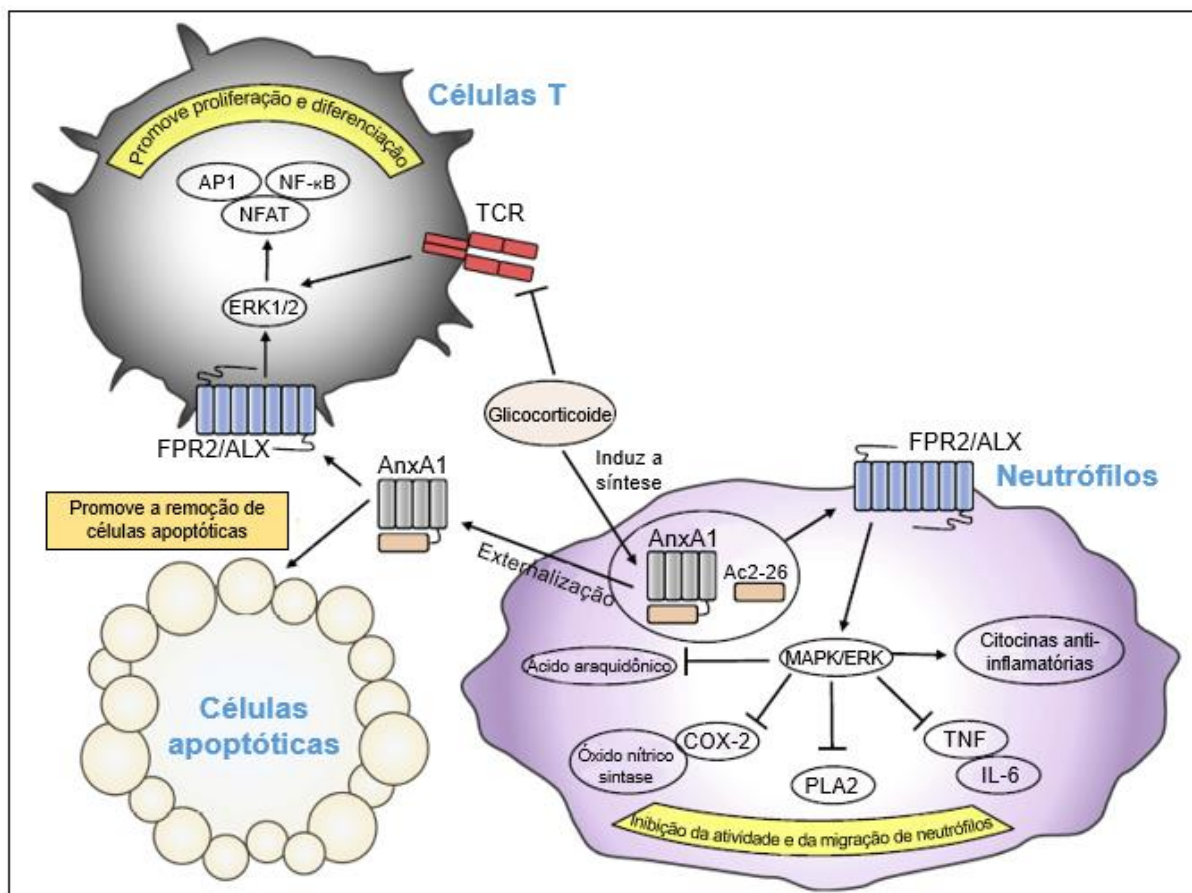


Figura 9 – Mecanismos da AnxA1 por meio da interação com o FPR2/ALX. A AnxA1 é induzida por GCs em neutrófilos e ativa diferentes vias de sinalização mediante a interação com o FPR2/ALX. Sua externalização promove ação sobre células apoptóticas e células T. *Ac2-26: um peptídeo N-terminal ativo de AnxA1; AnxA1: anexina A1; AP-1 – proteína ativadora 1 (do inglês, *activator protein 1*); COX-2: cicloxigenase 2; ERK – proteína cinase regulada por sinal extracelular (do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*); FPR2/ALX – receptor para peptídeos formilados do tipo 2 (do inglês, *formyl peptide receptors 2*); IL-6: interleucina 6; MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês, *mitogen activated protein kinases*); NFAT – fator nuclear de células T ativadas (do inglês, *nuclear factor of activated T cells*); NF-κB – fator nuclear kappa B (do inglês, *factor nuclear kappa B*); PLA2 – fosfolipase A₂ (do inglês, *phospholipase A₂*); TCR – receptor de células T (do inglês, *T cell receptors*); TNF – Fator de Necrose Tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*).
Fonte: adaptada de Shao e colaboradores (2019)¹¹⁶.

1.1.4 Exercício físico na dor e no processo inflamatório

Com o intuito de amenizar e tratar a dor, diversos recursos terapêuticos são empregados, sendo o exercício físico a estratégia mais utilizada no mundo¹⁵. Definido por Caspersen e colaboradores (1985)¹¹⁸, exercício físico é uma atividade física planejada, estruturada e repetitiva, cujo objetivo é melhorar ou manter a aptidão física. Embora não necessariamente desconfortável, o exercício físico é considerado um agente estressor aos sistemas biológicos¹¹⁹, pois altera a homeostase do organismo devido ao aumento instantâneo da demanda energética para a musculatura exercitada

e para o corpo como um todo, havendo necessidades energéticas acima das exigidas no nível de repouso¹²⁰.

Nesse contexto, assim como outros estressores, o exercício ativa o sistema nervoso simpático, resultando na produção de epinefrina e ativação do eixo HPA a partir da secreção de CRH pelo hipotálamo, o qual ativa a hipófise anterior, estimulando a liberação de ACTH. Este, por sua vez, estimula o córtex da glândula adrenal a liberar GCs¹²¹. Nessa perspectiva, a ativação do eixo HPA representa uma resposta fisiológica às necessidades energéticas, metabólicas, vasculares, neurofisiológicas ou psicológicas do exercício físico¹²². Por isso, os GCs, produto do eixo HPA, exercem muitas ações benéficas em indivíduos fisicamente ativos, aumentando a disponibilidade de substratos metabólicos para a necessidade energética muscular, mantendo a integridade vascular, capacidade de resposta durante o exercício e controle da reação exagerada do sistema imunológico aos danos musculares induzidos por exercícios repetidos¹²³.

Conforme mencionado anteriormente, um dos produtos da síntese dos GCs é a AnxA1, a qual mimetiza as funções biológicas desses hormônios ao interagir com o receptor FPR2/ALX⁸⁸ e atuar na modulação da dor, principalmente de origem inflamatória¹²⁴. Sugere-se que a AnxA1 exerça seus efeitos por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na transmissão da dor, inibição do acúmulo de neutrófilos mediante a prevenção da migração transendotelial, facilitando a liberação tônica de opioides a partir dos neutrófilos no local da inflamação ou por interromper a transmissão nociceptiva periférica ao suprimir a excitabilidade neuronal¹²⁴. Entretanto, não há estudos associando o efeito analgésico do exercício físico com a AnxA1, todavia, no estudo de Mazzardo-Martins (2010)¹⁷, camundongos foram submetidos à adrenalectomia bilateral, constatando-se que o efeito analgésico da natação fora revertido, sugerindo a participação do eixo HPA sobre a liberação de opioides endógenos e, conseqüentemente, inibição da dor.

De forma complementar, sabe-se que a prática de exercício físico gera benefícios à saúde física e mental, pois reduz a incidência de doenças¹²⁵, promove neuroproteção, neuroplasticidade, melhora da cognição, diminuição da ansiedade e da depressão, além de influenciar o limiar nociceptivo^{16,17}. Por essa razão, resultados de estudos não clínicos indicam que a analgesia induzida pelo exercício físico envolve a ativação de vários sistemas biológicos, incluindo sistemas opioides e não opioides, os quais contribuem para mudanças na sensação dolorosa provocada pelo exercício

físico¹²⁶. Em tempo, cabe mencionar que a hipótese mais comumente testada é a de que o exercício físico induz a liberação de opioides endógenos em sítios periféricos, espinais e/ou supraespinhais que contribuem para a modulação da dor¹²⁷.

Sabe-se que há diferentes modalidades e estratégias de treinamento a fim de melhorar o desempenho e promover a saúde, dentre os quais o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT – do inglês, *high intensity interval training*) e o exercício contínuo de intensidade moderada são os mais comuns¹²⁸. Tradicionalmente, visando ao alívio da dor, o treinamento contínuo de intensidade moderada é o que tem sido mais investigado^{16,17,27,28,129}. No entanto, há crescente interesse relacionado ao HIIT, pois se acredita que seus benefícios sejam iguais ou, até mesmo, superiores ao treinamento contínuo¹²⁹, devido ao maior gasto energético e à maior quantidade de trabalho realizada em intensidade mais alta durante uma única sessão de exercício físico, afinal, sua característica é a alternância de exercícios em alta intensidade com intervalos de baixa intensidade ou descanso^{128,130}. Ademais, pesquisas emergentes sugerem que o HIIT pode gerar efeitos benéficos em pacientes com doenças crônicas, devendo ser incluído no plano de tratamento desses pacientes a partir da seleção e adaptação adequada dos exercícios, respeitando as necessidades individuais¹²⁸.

Na literatura, observa-se que o HIIT tem sido mais comumente aplicado em doenças cardiovasculares¹³⁰ e metabólicas¹²⁸, havendo pouca associação com a dor. Nessa perspectiva, em estudo clínico, Astorino e colaboradores (2012)¹³¹ submeteram homens e mulheres ativos a seis dias de HIIT e observaram redução na classificação de esforço percebido e na dor muscular da perna. Hamed e Raoof (2014)¹³² demonstraram que mulheres obesas e diabéticas submetidas a 15 semanas de HIIT, em bicicleta ergométrica estacionária, apresentaram redução no componente sensorial e afetivo da dor neuropática. O'Leary e colaboradores (2017)¹³³, ao submeterem adultos saudáveis a seis semanas de HIIT e comparar com o treinamento contínuo de intensidade moderada, observaram que o HIIT foi eficaz em aumentar a tolerância à dor muscular. Todavia, no estudo de Júnior e colaboradores (2017)¹³⁴, homens saudáveis não treinados, submetidos a uma única sessão de treinamento contínuo ou HIIT, apresentaram efeitos similares quanto à dor muscular tardia.

Como demonstrado, o HIIT ainda é pouco explorado para o alívio da dor, apesar de haver evidências sugerindo que o efeito analgésico do exercício físico seja dependente da intensidade, já que intensidades mais altas provocam maior redução

da dor devido ao aumento da liberação de opioides endógenos. Então, considerando que a vantagem do HIIT está no tempo de realização, acredita-se que ele possa ser tolerável para os indivíduos incapazes de se exercitar por longos períodos¹³⁵.

Além disso, sabe-se que o exercício físico realizado de forma regular também é capaz de acelerar os processos de reparo tecidual após a inflamação¹⁸. Sobre esse assunto, Belmonte e colaboradores (2018)²⁹, em estudo não clínico de dor pós-isquemia crônica, demonstraram que a corrida em esteira, de moderada ou de alta intensidade, reduziu as concentrações espinais de citocinas pró-inflamatórias e aumentou as concentrações de citocinas anti-inflamatórias. Ademais, Brüggemann e colaboradores (2015)³⁰ destacaram os efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios do exercício aeróbico de baixa e moderada intensidade para as doenças respiratórias e demonstraram que o treinamento de natação de alta intensidade apresenta efeitos anti-inflamatórios no modelo experimental de asma alérgica, o que pode ser atribuído a uma redução na liberação local de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6), aumento na liberação de citocina anti-inflamatória (IL-10) e aumento nos níveis de enzima antioxidante (glutathione). Nesse cenário, observa-se que o exercício físico de alta intensidade apresenta potenciais benefícios no controle da dor e da inflamação, uma vez que atua sobre as concentrações de citocinas inflamatórias e, com isso, produz efeito analgésico duradouro.

Importa mencionar também que uma única sessão de exercício físico intenso induz um estado pró-inflamatório, observado por aumento nas concentrações séricas da enzima creatina cinase, proteína C-reativa e moléculas de adesão celular, além do aumento na secreção de cortisol e citocinas. Já o treinamento físico sistematizado pode levar a um estado anti-inflamatório local e sistêmico, promovendo adaptação e, ao mesmo tempo, proteção ao organismo contra o desenvolvimento de patologias inflamatórias crônicas¹³⁶.

Nesse contexto, compreender a fisiologia muscular e a fisiologia do exercício físico auxilia na compreensão da lesão muscular esquelética e nas condutas para prevenção e tratamento. Isso porque a lesão muscular esquelética pode ser desencadeada por trauma ou por estímulo excessivo de sobrecarga, o que vai gerar uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pela secreção de mediadores solúveis no local lesionado, influxo de proteínas plasmáticas, infiltração e acúmulo de leucócitos⁷⁵.

Assim sendo, nas primeiras horas após a lesão muscular, há uma infiltração inicial de neutrófilos seguida pelo recrutamento de monócitos sanguíneos (horas ou dias) que se acumulam no tecido lesionado e se diferenciam em macrófagos¹³⁷. Logo após a lesão, os monócitos se infiltram no músculo, diferenciam-se em macrófagos pró-inflamatórios (M1) e fagocitam miofibras danificadas e neutrófilos apoptóticos, um processo que desencadeia mudança fenotípica para um perfil anti-inflamatório (M2)¹³⁸. Durante os últimos estágios da inflamação, macrófagos M2 são predominantes e desempenham importante papel ativo na promoção do crescimento e regeneração muscular¹³⁹. Além disso, há uma complexa rede de sinalização envolvendo células imunes e células residentes na musculatura, incluindo miofibras, células satélites, endoteliais e fibroblastos, sendo que um aspecto-chave dessa regulação é o papel desempenhado pelos mediadores pró-resolutivos⁷⁵.

Então, durante os estágios iniciais da lesão tecidual, mediadores lipídicos pró-inflamatórios são produzidos localmente (PGs e LTs) e coordenam o processo inflamatório. Todavia, no estágio tardio da resposta inflamatória, há uma mudança no perfil desses mediadores lipídicos resultando na geração de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos com a função de ativar a fase de resolução da inflamação (LXs, Rvs, protectinas e maresinas)⁷⁵.

Com o intuito de verificar o efeito do exercício físico sobre as concentrações sanguíneas desses mediadores, Markworth e colaboradores (2013)³¹ submeteram indivíduos saudáveis a uma única sessão de exercício de resistência intenso e coletaram amostras de sangue periférico ao longo de 24 h após a execução. Nessa análise, foi constatado aumento precoce de LXs, com aumento expressivo de LXA₄ imediatamente após o exercício, enquanto os níveis de LXB₄ aumentaram no período de até 1 h de recuperação. Similarmente, a RvE₁ foi transitoriamente aumentada no sangue até 1 h após o exercício, decaindo rapidamente logo após. Já as RvD₁ e as protectinas apresentaram aumento somente após 2-3 h de recuperação e permaneceram elevadas na circulação após 24 h. Isso demonstrou que a biossíntese de mediadores lipídicos pró-resolutivos está aumentada em resposta a um exercício de resistência e que os mediadores lipídicos resolutivos exibem resposta temporal específica ao longo do tempo de recuperação pós-exercício.

Nessa mesma perspectiva, Gangemi e colaboradores (2003)³² submeteram nove indivíduos saudáveis ao exercício máximo em ciclo ergômetro. Amostras de sangue e urina foram coletadas 3 min, 6 h e 24 h após a interrupção do teste. Como

resultado, observou-se aumento significativo de LXA₄ imunorreativa na excreção urinária ao fim do exercício, retornando ao nível basal após 6 h e com posterior aumento, em menor proporção, após 24 h. Tais achados indicam que o esforço físico máximo pode induzir a biossíntese de LXs e de seus metabólitos, podendo contrabalancear a ação dos mediadores pró-inflamatórios induzidos pelo exercício físico e, assim, representar um dos mecanismos benéficos dessa prática, em longo prazo, sobre o sistema cardiovascular, bem como no próprio dano celular local. Com o aumento desses mediadores pró-resolutivos, obtém-se uma limitação da extensão do microtrauma associada ao exercício, representando assim um mecanismo de defesa contra a inflamação induzida por estresse.

Além de limitar a infiltração de neutrófilos e promover o recrutamento de monócitos, os mediadores pró-resolutivos podem atuar diretamente sobre o crescimento e desenvolvimento das células musculares. Por exemplo, o receptor FPR2/ALX é expresso nas células mioblásticas esqueléticas da linhagem C2C12, sendo demonstrado que o peptídeo AnxA1, outro ligante desse receptor, promove migração e diferenciação celular^{140,141}.

Assim, sabe-se que a AnxA1 está envolvida em diferentes processos moleculares e celulares, incluindo sinalização anti-inflamatória, manutenção da integridade da matriz extracelular e do citoesqueleto, crescimento tecidual e apoptose. Todavia, novas descobertas mostram que a AnxA1 endógena modula positivamente a diferenciação de células mioblásticas promovendo a migração de células satélites e, conseqüentemente, a diferenciação de músculos esqueléticos¹⁴². Isso fortalece a hipótese de que a AnxA1 possivelmente seja produzida e liberada durante e após o exercício físico e que contribui para a regeneração do tecido muscular esquelético, tornando-se então um interessante alvo terapêutico.

Isto posto, sabe-se que a AnxA1 está presente em condições extremas de inflamação. Além disso, em modelos animais, fora observado o efeito anti-inflamatório da AnxA1 exógena após interação com receptores FPR2/ALX presentes nos leucócitos^{88,143}. Ao interagir com o receptor FPR2/ALX, a AnxA1 também pode induzir a clivagem da L-selectina e, como consequência, desprender os leucócitos aderentes no endotélio, regulando, dessa forma, respostas celulares envolvidas no controle da migração celular¹⁴³.

Nesse sentido, observa-se que tanto o exercício físico quanto a AnxA1 são capazes de interferir em várias etapas do processo inflamatório. Contudo, apesar de

haver evidências de que o exercício físico aumenta a síntese de mediadores pró-resolutivos, como LXs e Rvs, não há relatos na literatura relacionando a ação desses mediadores na analgesia induzida pelo exercício físico ou a participação da AnxA1 no efeito anti-hiperalgésico do exercício. Por fim, o fato de que a AnxA1 é liberada a partir do GC, o qual é liberado durante o exercício físico, justifica a investigação do envolvimento da via AnxA1/FPR2-ALX no efeito anti-hiperalgésico causado pela natação contínua e intervalada em um modelo animal de dor pós-operatória.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento da via AnxA1-FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico da natação contínua e intervalada em um modelo não clínico de dor pós-operatória.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram organizados em três conjuntos de experimentos:

1. Caracterizar os efeitos da natação, contínua e intervalada, no modelo animal de dor pós-operatória:
 - Efeito anti-hiperalgésico.
 - Efeito antiedematoso (espessura da pata).
 - Efeito antitérmico (temperatura da pata).
2. Verificar o envolvimento espinal e periférico dos receptores FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico da natação contínua e intervalada.
3. Na pele da pata, no músculo tríceps sural e na medula espinal, investigar o efeito da natação contínua e intervalada sobre:
 - As concentrações de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10).
 - O imunoconteúdo de AnxA1 e FPR2/ALX.
 - O imunoconteúdo de marcadores imunológicos para macrófagos M1 (NOS-2 e CD86) e M2 (CD206 e arginase-1).

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

A pesquisa se caracteriza como experimental não clínica de natureza quantitativa¹⁴⁴.

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Para a execução deste estudo, as seguintes substâncias foram utilizadas: antagonista WRW4 (Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-NH₂, Tocris, Bioscience, Bristol, RU); solução de cloreto de sódio 0,9% – NaCl (LBS, São Caetano do Sul, SP, BR); cloridrato de xilazina 2% (Syntec, São Paulo, Brasil); cloridrato cetamina 10% (Syntec, São Paulo, Brasil); isoflurano (2-cloro-2- (difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano (Bio-Chimico, BR); solução povidine-iodo® 10%; xampu neutro (Johnson's Baby – Johnson & Johnson, EUA).

Para o Western Blotting foram utilizados: tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40] 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); coquetel de inibidores de proteases 1% (P8340 - Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA); membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); anticorpo monoclonal de coelho anti-AnxA1 (1:1000, v/v, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA); anticorpo primário contra FPR2/ALX (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-iNOS (NOS-2) (NBP1-33780, Novus Biologicals, Centennial, CO, EUA); anticorpo monoclonal *mouse* anti-CD86 (ab213044, Abcan, Cambridge, MA, EUA), anticorpo monoclonal rabbit anti-arginase-1 (93668S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); anticorpo policlonal Goat anti-MMR/CD206 (AF2535, R&D Systems®, Minneapolis, EUA); anticorpo secundário conjugado com peroxidase (cabra anti-coelho-HRP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); kit de quimiluminescência (ECL; Thermo 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 os Ensaios de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foram utilizados: salina tamponada com fosfato (Lote 70711012, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil); Tween 20 (0,05%) (Lote 1000422, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) (0,1 mM) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA); ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) (10 mM); aprotinina (2 ng/ml); cloreto de benzetônio (0,1 mM); albumina de soro bovino (Inlab, São Paulo, SP, Brasil); kits de Elisa para camundongos (IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e leitor de placas (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China).

Os seguintes equipamentos foram utilizados: monofilamento de von Frey de 0,6g (VFH, Stoelting, Chicago, USA); caixa de acrílico com dimensões de 9 x 7 x 11 cm (Alumecril, São José, SC, Brasil); tela de arame com malha de 6 mm (70 x 40 cm – confecção própria); micrômetro universal digital da marca Insize (Loganville, Georgia, EUA); câmera termográfica FLIR-E63900, T198547 com precisão de ± 2 °C, resolução de 19200 (160 x 120) da FLIR Systems (Suécia); microseringa Hamilton de 25 μ l (Hamilton, Birmingham, RU); seringa 1 ml (Descarpack); caixa plástica (540 x 390 x 325 mm), dividida com acrílico em oito compartimentos (170 x 110 mm); plataforma de elevação em fio não flexível (confecção própria); aparelho de anestesia inalatória NARCOFLUX (NARCOSUL, Porto Alegre, BR); bisturi de lâmina número 11 (Solidor); fio de nylon 6.0 mm (Technofio). Para as análises estatísticas foi utilizado o *software* Graphpad Prism, versão 8.0 (GraphpadSoftware, La Jolla, CA, EUA).

3.3 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos e descritos de acordo com as diretrizes ARRIVE¹⁴⁵, sendo utilizado camundongos *Swiss* machos (com 8 semanas e 35 a 45 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), os quais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx), da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), com grades de aço inox na parte superior, fundo recoberto com maravalha e sem enriquecimento ambiental. Foram mantidos 10 animais por caixa, os quais permaneceram em ambientes aclimatados a 22 ± 2 °C, no ciclo 12 h-claro / 12 h-escuro (claro a partir das 7 h, com início dos experimentos), com acesso livre à água e à ração (Nuvilab®) e aclimatizados no laboratório por, pelo

menos, 1 h antes dos testes. Para distribuição entre os grupos, os animais foram homogeneamente distribuídos de acordo com a resposta basal no teste da hiperalgesia mecânica.

3.3.1 Critérios de exclusão

Os animais que apresentaram, na avaliação basal do teste de von Frey, uma porcentagem de retirada da pata maior do que 30% foram excluídos do estudo. Além disso, para refinamento do modelo experimental, redução do sofrimento dos animais, como também manutenção do bem-estar animal, foi aplicada uma escala prática para a verificação de sinais clínicos de enfermidade, seguindo as diretrizes de Hawkins e colaboradores (2011)¹⁴⁶.

3.3.2 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi baseado em Wayne e colaboradores (2008)¹⁴⁷ por meio da equação para determinar o número de animais de um grupo, sem reposição, utilizando um intervalo de confiança de 95%. O cálculo estatístico para definir o tamanho da amostra baseou-se no teste de estimativa aplicado à fórmula: $N = \{[(z \text{ alfa} + z \text{ beta}) * s]/\sigma\}^2$. O teste se baseia no cálculo do intervalo de confiança da diferença entre as médias ou entre proporções (σ); do desvio-padrão (s); do parâmetro alfa, que é a probabilidade aceitável de achar uma diferença quando, na verdade, ela não existe (erro do Tipo I; falso verdadeiro; quanto menor o alfa escolhido, maior será a amostra necessária); e do parâmetro beta, que é o risco aceitável de estar perdendo uma diferença que realmente existe (erro do Tipo II).

Assim sendo, são considerados os pressupostos apresentados a seguir para calcular o número de animais.

a) O valor de alfa foi fixado em 0,05. Assim, o valor de z alfa baseado na tabela de valores para z , distribuição bicaudal, é de 1,96.

b) O valor de beta foi fixado em 0,10. Dessa forma, o valor de z beta baseado na tabela de valores de z , distribuição unicaudal, é de 1,28.

c) O valor da diferença entre as médias dos grupos como sendo pelo menos 40% (baseado em dados experimentais prévios do nosso laboratório). Experimentos biológicos têm embutido um erro da ordem de 10-15% (resultantes de variações

individuais, erro no procedimento cirúrgico, erros de dosagem etc.). Diferenças entre dois grupos que sejam menores do que 20% do valor da média de cada grupo podem aumentar a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II.

d) O valor do desvio-padrão como sendo uma média de 35% do valor das médias (baseado em dados experimentais prévios do nosso laboratório).

Aplicando os valores na fórmula apresentada anteriormente, temos: $N = \{[(1,96 + 1,28) * 35] / 40\}^2 = 8$. Portanto, um número de oito animais em cada grupo experimental foi considerado suficiente, garantindo conclusões experimentais válidas, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas existem, tampouco estar observando diferenças onde elas não existam.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo foi dividido em três etapas. A primeira etapa consistiu em caracterizar os efeitos da natação no modelo animal de dor pós-operatória. Para isso, os camundongos foram submetidos à incisão plantar e, posteriormente, à natação contínua ou intervalada, seguida pelas avaliações comportamentais após 30 min de cada sessão, como ilustrado no fluxograma seguinte (Figura 10):

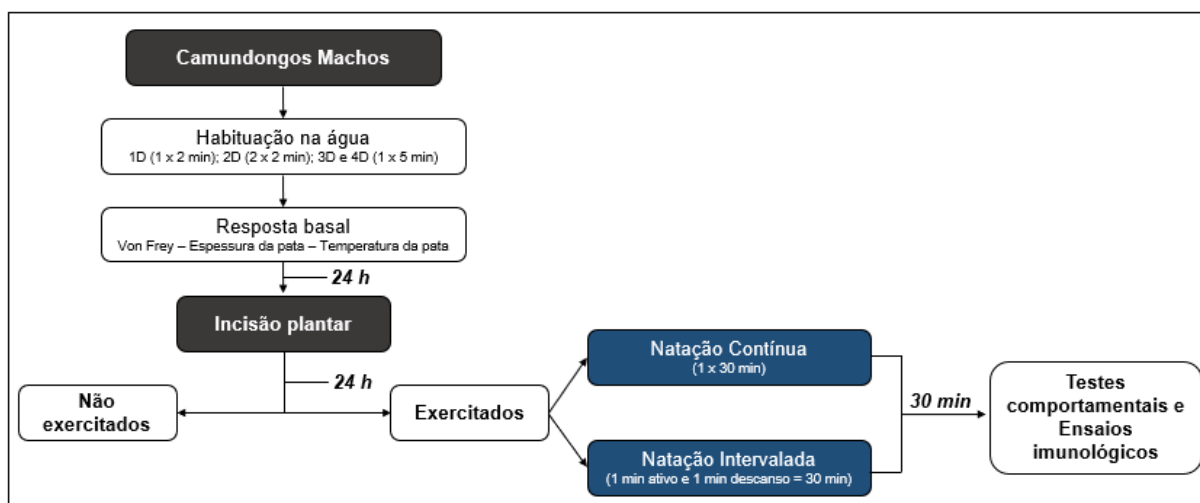


Figura 10 – Fluxograma ilustrativo referente ao delineamento experimental. D = dia.

Finalizada essa etapa de caracterização, iniciou-se a segunda fase: verificar o envolvimento espinal e periférico dos receptores FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico da natação contínua e intervalada, mediante a administração do antagonista WRW4 (Figura 11). Assim, novos animais foram utilizados, de acordo com

os mesmos procedimentos anteriores (Figura 10), sendo que o antagonista foi administrado no primeiro e no quarto dia após a incisão plantar.

A terceira etapa consistiu em investigar o efeito da natação contínua e intervalada sobre as concentrações de citocinas inflamatórias e o imunoconteúdo de AnxA1, FPR2/ALX, marcadores imunológicos para macrófagos M1 (NOS-2 e CD86) e M2 (CD206 e arginase-1) na pele da pata, no músculo tríceps sural e na medula espinal. Para isso, novos grupos de animais foram utilizados e, no terceiro dia da natação, foi realizada a Morte Indolor Assistida (MIA) 30 min após o exercício físico, sendo coletadas as amostras necessárias (Figura 11).

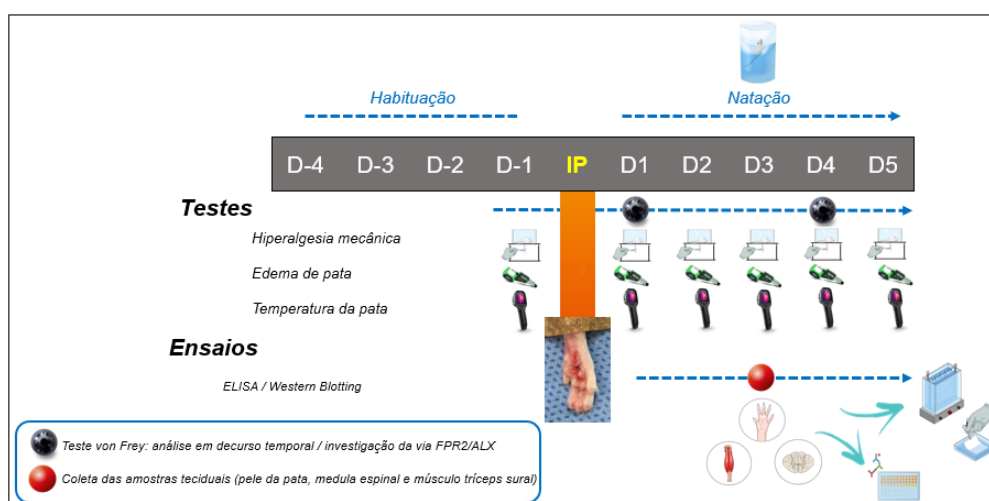


Figura 11 – Desenho experimental. Esquema ilustrativo referente aos experimentos realizados. D = dia.

3.4.1 Grupos experimentais

Foram utilizados 152 animais para a realização deste estudo, sendo que, para cada experimento, os animais foram distribuídos conforme descrito na sequência.

- **Experimento 1 – Caracterização dos efeitos da natação:** os camundongos machos foram submetidos à incisão plantar e, em seguida, homogeneamente distribuídos em três grupos, totalizando 24 animais (n = 8).
 - Controle (com incisão plantar e sem exercício).
 - Natação contínua (com incisão plantar e exercício contínuo).
 - Natação intervalada (com incisão plantar e exercício intervalado).

Após o exercício físico, foram realizados os testes comportamentais para a avaliação da resposta hiperálgica, espessura e temperatura da pata.

- **Experimento 2 – Envolvimento dos receptores FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico da natação:** novos grupos de animais foram submetidos à incisão plantar e, em seguida, homogeneamente distribuídos nos seguintes grupos, totalizando 96 animais (n = 8).
 - Controle + WRW4 intraplantar (i.pl.).
 - Controle + WRW4 intratecal (i.t.).
 - Controle + veículo i.pl.
 - Controle + veículo i.t.
 - Natação contínua + WRW4 i.pl.
 - Natação contínua + WRW4 i.t.
 - Natação contínua + veículo i.pl.
 - Natação contínua + veículo i.t.
 - Natação intervalada + WRW4 i.pl.
 - Natação intervalada + WRW4 i.t.
 - Natação intervalada + veículo i.pl.
 - Natação intervalada + veículo i.t.

- **Experimento 3 – Concentração de citocinas inflamatórias e marcadores imunológicos para macrófagos M1 e M2 na pele da pata, no músculo tríceps sural e na medula espinal, após a natação:** novos animais foram submetidos à incisão plantar e, em seguida, homogeneamente distribuídos em quatro grupos, totalizando 32 animais (n = 8).
 - Naive (sem incisão plantar e sem exercício).
 - Controle.
 - Natação contínua.
 - Natação intervalada.

3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

3.5.1 Modelo animal de dor pós-operatória

O modelo de dor pós-operatória induzido pela incisão plantar foi realizado conforme previamente descrito por Pogatzki e Raja (2003)⁵⁴. Neste procedimento, os camundongos foram anestesiados com 1–2% de isoflurano a 100% de O₂, sendo

realizada uma incisão longitudinal de 5 mm na pele e fáscia da parte plantar da pata, com um bisturi de lâmina número 11. Na sequência, foi feita sutura da pele com um fio de nylon 6.0 mm, coberta com solução povidine-iodo® 10%. Para a recuperação, os animais foram mantidos em suas caixas-moradias.

3.5.2 Protocolo de natação para camundongos

O protocolo de natação utilizado neste estudo foi adaptado de Martins e colaboradores (2017)¹⁴⁸. Assim sendo, os animais foram colocados em uma caixa plástica, medindo 540 x 390 x 325 mm, com oito compartimentos (divididos por acrílico) de 170 x 110 mm cada (Figura 12A), contendo aproximadamente 35 litros de água (Figura 12B) a 35 °C. Após cada sessão de natação, os animais foram gentilmente colocados em maravalha limpa para facilitar a secagem do corpo.

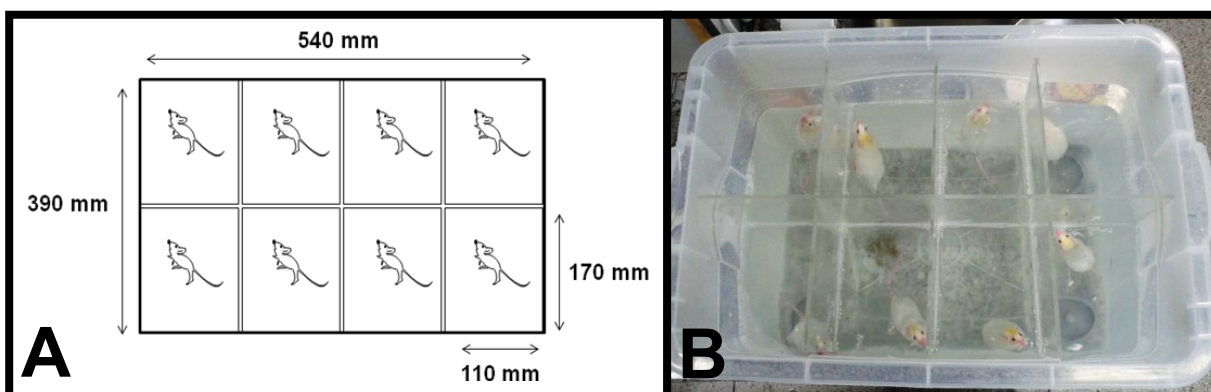


Figura 12 – Banheira para natação. Desenho ilustrativo quanto ao número de animais e às dimensões da caixa plástica utilizada no protocolo de natação do estudo (A). Fotografia representativa de camundongos durante uma sessão de natação na caixa plástica, em que os animais foram submetidos ao tratamento (B).

Fonte: adaptada de Mazzardo-Martins e colaboradores (2010)¹⁷.

Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de habituação, sendo que, no primeiro dia, foram realizadas duas sessões de natação por 30 s. No segundo dia, foram realizadas duas sessões de natação por 2 min. No terceiro e no quarto dia, foi realizada uma sessão de natação por 5 min. Finalizado esse período de habituação, os animais foram homogeneamente distribuídos em três grupos: controle, natação contínua e natação intervalada. Além disso, foi acrescentado xampu líquido neutro, na quantidade de 1 ml por compartimento (totalizando 8 ml), a fim de reduzir a tensão superficial da água e evitar o comportamento de boiar dos animais.

Destaca-se que os animais do grupo controle (não exercitado) foram submetidos diariamente à natação com duração de 30 s. Já os animais submetidos à natação contínua realizaram uma única sessão de natação por 30 min, enquanto os animais da natação intervalada realizaram 1 min ativo e 1 min de descanso ao longo dos 30 min. Para facilitar esse processo, foi utilizada uma plataforma de elevação a fim de deixar os animais no mesmo ambiente. A natação, para todos os grupos, foi de 5 dias (exceto para o experimento 3 – ver item 3.4.1).

3.5.3 Testes comportamentais

3.5.3.1 Mensuração da hiperalgesia mecânica

Para mensurar a hiperalgesia mecânica foi utilizada uma plataforma (70 x 40 cm) que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. De modo a facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (Figura 13A). A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando o monofilamento de von Frey de 0,6g, aplicado na pata posterior direita (com incisão plantar) quando o animal estivesse com as quatro patas apoiadas sobre a tela.

A aplicação do filamento de von Frey foi realizada em orientação vertical com pressão suficiente para provocar a curvatura do filamento e mantida até a resposta de retirada da pata, caracterizando a hiperalgesia, ou por até, no máximo, 3 s (Figura 13B). Cada animal recebeu 10 aplicações do filamento de von Frey, sendo computada a quantidade de vezes em que houve a retirada da pata sobre a tela, registrando-a em porcentagem, como indicativo da resposta hiperalgésica¹⁴⁹. As avaliações foram realizadas no pré-operatório e diariamente até o quinto dia pós-operatório, sendo que no primeiro e no quarto dia foi realizada a análise em decurso temporal.

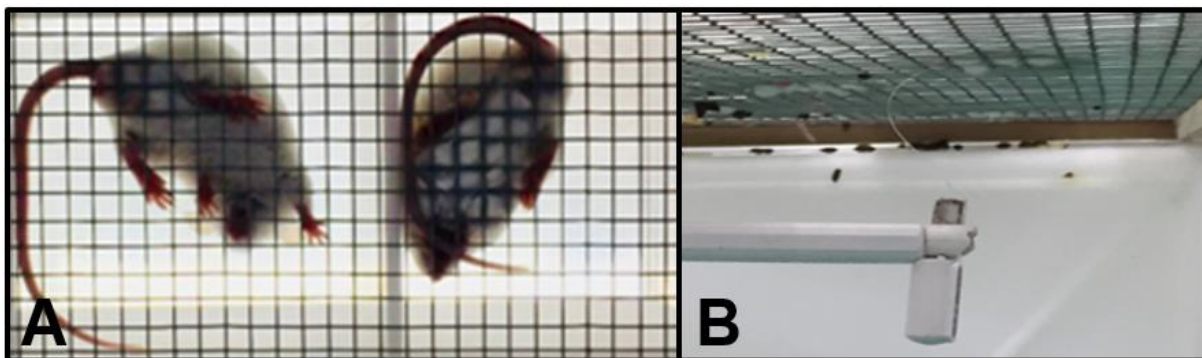


Figura 13 – Teste de von Frey. Vista inferior da câmara de observação (A). Aplicação do filamento de von Frey (B).

3.5.3.2 Avaliação do edema da pata

A mensuração do edema da pata foi realizada mediante um micrômetro digital utilizado para determinar a espessura do coxim da pata traseira direita. As medidas foram expressas pela diferença do valor obtido entre a mensuração pré-operatória e as subsequentes da mesma pata. Para essa avaliação foram utilizados os mesmos animais do teste da hiperalgesia mecânica, pois se trata de uma análise não invasiva e não dolorosa¹⁴⁹. Além disso, as avaliações foram realizadas no pré-operatório, após a incisão plantar (do primeiro ao quinto dia pós-operatório), assim como após a avaliação da hiperalgesia mecânica.

3.5.3.3 Avaliação da temperatura da pata

O registro da temperatura da superfície da pata traseira direita (no ponto médio da face plantar) foi realizado com o auxílio de uma câmera termográfica. As medidas foram expressas pela diferença do valor obtido entre a mensuração pré-operatória e as subsequentes da mesma pata. Para essa avaliação foram utilizados os mesmos animais do teste da hiperalgesia mecânica, pois se trata de uma análise não invasiva e não dolorosa¹⁴⁹. As avaliações foram realizadas no pré-operatório, após a incisão plantar (do primeiro ao quinto dia pós-operatório), assim como após a avaliação da hiperalgesia mecânica.

3.5.4 Avaliação do envolvimento do receptor FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico da natação

Para investigar o envolvimento dos receptores FPR2/ALX espinais e periféricos na hiperalgesia inflamatória, foram utilizados camundongos Swiss machos submetidos a uma incisão plantar na pata posterior direita, distribuídos em grupos de animais exercitados e não exercitados. No primeiro e no quarto dia da natação ou incisão plantar, os animais foram pré-tratados com WRW4 (antagonista para receptores FPR2/ALX, 10 µg/kg/sítio)¹⁵⁰ ou NaCl (0,9%, 5 µL i.t. ou 20 µL i.pl.). Após 15 minutos, os animais foram submetidos ao exercício físico. Trinta minutos após o período de tratamento dos animais com a natação, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à hiperalgesia mecânica.

3.5.5 Ensaios imunológicos

3.5.5.1 Preparação das amostras para *Western Blotting*

No terceiro dia após a natação, os animais foram submetidos à MIA, e as amostras do músculo tríceps sural, medula espinal e pele da superfície ventral da pata foram coletadas e armazenadas a -80 °C até o seu processamento¹⁵¹. As amostras da medula espinal foram homogeneizadas manualmente (com o auxílio de micropistilos) em tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% e, em seguida, incubadas em gelo por 30 min.

As amostras de pele da pata e do músculo tríceps sural foram pulverizadas e incubadas em tampão de lise RIPA no gelo por 30 min. Os homogenatos foram centrifugados a 6.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante (correspondente ao extrato total) foi coletado, sendo uma alíquota separada para a dosagem de proteína em cada amostra, a qual foi determinada por meio do método de Bradford¹⁵². Ao restante do sobrenadante foi adicionado o tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%) na proporção de 1:6. As amostras foram fervidas (95 °C; 5 min) e permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

3.5.5.2 Separação de proteínas e imunodeteção

Para a realização dos ensaios de imunodeteção, todas as amostras foram mantidas em gelo até o completo descongelamento. Após, quantidades iguais de proteínas para cada amostra (60 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (8%). A etapa de transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de fluoreto de polivinilideno foi realizada sob as seguintes condições: 90 V e 30 mA por 1 h e 30 min. Em seguida, as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%) para a visualização das proteínas. Após lavagens em TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, Tween-20 0,05%), para a retirada do excesso do corante, as membranas foram imersas em solução de TBS-T contendo BSA 5%, por 1 h em temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas.

Na sequência, as membranas foram incubadas durante 14-16 h (2-8 °C), sob agitação, com os anticorpos primários, diluídos em TBS-T contendo BSA 1%, contra as proteínas de interesse: FPR2/ALX (1:500), AnxA1 (1:1000), NOS-2 (1:2000), CD86 (1:1000), CD206 (1:1000) e arginase-1 (1:1000). Ao término do período de incubação, as membranas foram lavadas durante 30 min com TBS-T e, em seguida, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:10000, cabra anti-coelho-HRP), por 1 h em temperatura ambiente. Após esse período, uma nova lavagem de 30 min com TBS-T foi realizada, seguida pela exposição das membranas durante 1 min ao kit de quimiluminescência e revelação mediante um fotodocumentador¹⁵¹. As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do *software* de aquisição das imagens (iBright Imaging Systems). Os dados foram normalizados utilizando os valores obtidos da densitometria da coloração pelo vermelho de Ponceau e expressos graficamente como unidades arbitrárias¹⁵³.

3.5.5.3 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Foram coletadas amostras da pele da pata, músculo tríceps sural e da medula espinal 30 min após a terceira sessão de natação (contínua e intervalada). Nesse momento, os animais foram eutanasiados e as amostras foram coletadas e armazenadas no freezer a -80 °C para posterior análise. Para a quantificação, as amostras de tecido foram homogeneizadas com salina tamponada com fosfato

contendo Tween 20 (0,05%), PMSF (0,1 mM), EDTA (10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzetônio (0,1 mM). O homogenato foi transferido para microtubos e, em seguida, centrifugado a 3.000 x g por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi obtido e estocado para análises posteriores a -80 °C.

No sobrenadante, a quantidade de proteínas foi verificada usando albumina de soro bovino como padrão, de acordo com o método de Bradford¹⁵¹. Alíquotas de 100 µL foram utilizadas para mensurar as concentrações de IL-1β, IL-4, IL-6 e IL-10 por meio de kits de ELISA para a mensuração de proteínas em camundongos (Kits da R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante. Os valores obtidos foram estimados por meio da interpolação de uma curva-padrão, utilizando-se ensaio colorimétrico, medido a 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um espectrofotômetro (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China). Dessa forma, todos os resultados foram expressos em pg/mg de proteína^{154,155}.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Hiperalgesia mecânica	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Frequência de retirada (%). Média ± Desvio-padrão
Edema de pata	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Espessura da pata (µm). Média ± Desvio-padrão
Temperatura da pata	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Graus Celsius (°C). Média ± Desvio-padrão
Concentração de citocinas (IL-1β, IL-4, IL-6 e IL-10)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	pg/mg de proteína. Média ± Desvio-padrão
Imunoconteúdo de AnxA1 e do receptor FPR2/ALX	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Unidades arbitrárias. Média ± Desvio-padrão
Imunoconteúdo dos marcadores para macrófagos M1 (NOS-2 e CD86)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Unidades arbitrárias. Média ± Desvio-padrão
Imunoconteúdo dos marcadores para macrófagos M2 (CD206 e arginase-1)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Unidades arbitrárias. Média ± Desvio-padrão
Incisão plantar	Independente	Qualitativa	Sim / Não
Natação Contínua	Independente	Qualitativa	Sim / Não
Natação Intervalada	Independente	Qualitativa	Sim / Não
Tratamento com antagonista WRW4 ou veículo	Independente	Qualitativa	Sim / Não

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, por serem dados paramétricos, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão da média. Em todas as análises, valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o *software* GraphPad Prism 8.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Os experimentos foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais, da UNISUL, com o protocolo número: 18.034.2.07.IV.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e o guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes¹⁵⁶, bem como em conformidade com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)¹⁵⁷.

O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram o mínimo necessário para demonstrar o consistente efeito do tratamento com a natação. A indução da MIA, de acordo com a Resolução nº 1.000, 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária –, foi realizada sob a supervisão do médico veterinário responsável¹⁵⁸. Os animais receberam uma dose excessiva de anestésico, xilazina (1,5 mg/kg) e cetamina (3 mg/kg), por via intraperitoneal e, em seguida, os tecidos foram coletados e devidamente processados para a realização dos ensaios bioquímicos.

4. ARTIGO

Como resultado desta Tese, realizar-se-á a confecção de um artigo científico envolvendo todos os aspectos analisados. Inicialmente, o artigo será submetido à revista “*The Journal of Pain*” (Qualis A1 e fator de impacto 5.820).

A formatação do artigo está de acordo com as normas da revista selecionada, cujo acesso é possível pelo endereço eletrônico:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623147?generatepdf=true

Evidence for the Involvement of Pro-Resolving Mechanism in the Analgesic Effect of Continuous and High-Intensity Interval Swimming in a Mouse Model of Postoperative Pain

Daniela Dero Ludtke^{a,b,c}, Júlia Koerich Ferreira^{b,c}, Paula Franson Fernandes^{a,b},
Taynah de Oliveira Galassi^{a,b}, Bruna Hoffmann de Oliveira^{a,b}, Afonso Shiguemi Inoue
Salgado^d, Veronica Vargas Horewicz^{a,b}, Anna Paula Piovezan^{a,b}, William Robert
Reed^e, Franciane Bobinski^{a,b,c}, Daniel Fernandes Martins^{a,b,c,*}

^aPostgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, Santa Catarina, Brazil.

^bExperimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, Santa Catarina, Brazil.

^cPhysical Therapy Graduate Program, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, Santa Catarina, Brazil.

^dIntegrative Physical Therapy Residency Program - Philadelphia University Center, Londrina, PR, Brazil.

^eDepartment of Physical Therapy, School of Health Professions, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA.

Disclosures:

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – Brasil (PIBITI). The authors report no conflicts of interest.

*** Corresponding author:**

Daniel F. Martins, PT, PhD.

Experimental Neurosciences Laboratory,

Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina,

Campus Grande Florianópolis, Palhoça, Santa Catarina, Brazil.

Phone: +55 48 3279-1057;

E-mail: danielmartinsfisio@hotmail.com; daniel.martins@animaeducacao.com.br

Abstract

Annexin A1 has potential benefit for the treatment of pain and inflammation, as the activation of its receptor FPR2/ALX exerts anti-inflammatory and pro-resolving effects. This protein mediates the action of glucocorticoids, which are released with physical exercise, by activating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The present study evaluated the involvement of the ANXA1-FPR2/ALX pathway in the antihyperalgesic effect of swimming in a non-clinical model of postoperative pain. Experimental type, this study used male Swiss mice (35-45g) kept under constant conditions at the Laboratory of Experimental Neuroscience at UNISUL. Postoperative pain was induced by a plantar incision, and in the different experiments, 152 mice were used, allocated in groups of animals (n=8) not exercised and exercised. The exercised animals were submitted to five days of swimming, continuous or interval, whose effects were analyzed by behavioral and biochemical tests. To verify the involvement of FPR2/ALX receptors, the antagonist WRW4 was used prior to swimming. Swimming had an anti-hyperalgesic and anti-edematous effect; WRW4 prevented anti-hyperalgesia caused by swimming protocols; Swimming increased the immunocontent of AnxA1; decreased FPR2/ALX; increased IL-1 β , IL-6 and IL-10; reduced IL-4; and only continuous swimming reduced CD86 and increased NOS-2 and arginase-1. Swimming, continuous and interval, induces an antihyperalgesic effect in the animal model of postoperative pain and FPR2/ALX receptors are involved in this process. In addition, exercise had an anti-inflammatory effect by reducing edema and increasing the concentration of IL-10, and only continuous swimming was able to reduce CD86 and increase arginase.

Perspective: This article presents the participation of the AnxA1-FPR2/ALX pathway in the effects of continuous and interval swimming on postoperative pain, in an animal model, using behavioral and biochemical tools. These results provide support to understand the mechanism of action of the therapy and thus contribute to the proper management of inflammatory pain.

Keywords: Pain postoperative; Swimming; HIIT; Annexin A1.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, os achados sugerem alguns pontos sobre a natação contínua e a intervalada.

- 1) Apresentam efeito anti-hiperalgésico, sendo este mais prolongado na natação intervalada.
- 2) Possuem efeito anti-inflamatório, por reduzir edema e aumentar a concentração de IL-10.
- 3) Ativam receptores FPR2/ALX, tanto em nível periférico quanto em nível central.
- 4) Aumentam o imunoconteúdo de AnxA1 na medula espinal.
- 5) Retornam o imunoconteúdo de FPR2/ALX às condições basais na pele da pata e no músculo tríceps sural.
- 6) A natação contínua reduziu o imunoconteúdo de NOS-2 e aumentou arginase-1.

Dessa forma, conclui-se que o exercício de natação, contínua e intervalada, é efetivo na redução da nocicepção, sendo esse efeito mediado, pelo menos em parte, pela ativação de receptores FPR2/ALX centrais e periféricos. Além disso, a natação apresenta ação anti-inflamatória e pró-resolutiva, atuando sobre a concentração de citocinas inflamatórias e marcadores imunológicos para macrófagos. Nesse contexto, esses resultados confirmam e estendem a literatura, fortalecendo o conhecimento a respeito do mecanismo de ação do exercício físico e dos mediadores pró-resolutivos, especificamente da AnxA1, ao demonstrar a participação destes também em condição clínica patológica.

No cenário da dor, o exercício físico já faz parte dos programas de tratamento, sendo assim, os dados do presente estudo confirmam as pesquisas clínicas e demonstram, em nível mais detalhado, o envolvimento da via AnxA1-FPR2/ALX, que pode nortear o mecanismo de ação do exercício físico no tratamento da dor, sendo este uma abordagem integrativa interessante, sem os efeitos colaterais produzidos pelos fármacos. Além disso, a natação em si, praticada na intensidade correta, pode ser usada como uma abordagem adjuvante em sinergia ao uso de medicamentos com mecanismo pró-resolutivo, reduzindo os efeitos adversos.

Para estudos futuros, sugerem-se análises bioquímicas mais detalhadas a fim de mapear, com maior precisão, o efeito pró-resolutivo do exercício físico, enfatizando a concentração de neutrófilos e macrófagos, bem como a associação com o eixo HPA

e o sistema opioide, com o objetivo de fortalecer cientificamente a hipótese aqui levantada.

REFERÊNCIAS

1. Neto AO, Costa CMC, Siqueira JTT e colaboradores. Dor: Princípios e Práticas. In: Chaves LD. Dor como 5º sinal vital. Porto Alegre: Artmed; 2009. p. 109.
2. Dinakar P, Stillman AM. Pathogenesis of Pain. *Semin Pediatr Neurol*. 2016; 23(3):201-8.
3. Feizerfan A, Sheh G. Transition from acute to chronic pain. *Contin Educ Anaesthesia, Crit Care Pain*. 2015; 15(2):98-102.
4. Neto AO, Costa CMC, Siqueira JTT e colaboradores. Dor: Princípios e Práticas. In: Filho JV, Rosa CP, Santos APSV. Dor pós-operatória. Porto Alegre: Artmed; 2009. p. 506.
5. Paul Glare P, Aubrey KR, Myles OS. Transition from acute to chronic pain after surgery. *Lancet*. 2019; 393(10180):1537-46.
6. Baker DW. History of the joint commission's pain standards: lessons for today's prescription opioid epidemic. *JAMA*. 2017; 317:1117-8.
7. James N Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15(8):551-67.
8. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018; 1803:57-79.
9. Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol*. 2015; 27(3):149-60.
10. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014; 510(7503):92-101.

11. Bena S, Brancaleone V, Wang JM, Perretti M, Flower RJ. Annexin A1 interaction with the FPR2/ALX receptor: Identification of distinct domains and downstream associated signaling. *J Biol Chem.* 2012; 287(29):24690-7.
12. Norling LV, Spite M, Yang R, Flower RJ, Perretti M, Serhan CN. Cutting edge: Humanized nano pro-resolving medicines mimic inflammation- resolution and enhance wound healing. *J Immunol.* 2011; 186(10):5543-7.
13. Souza P, Norling LV. Implications for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid-derived resolvins as therapeutic for arthritis. *Eur J Pharmacol.* 2016; 785:165-73.
14. Kirsten R Ambrose KR, Golightly MY. Physical exercise as non-pharmacological treatment of chronic pain: Why and When. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2015; 29(1):120-30.
15. Rice D, Nijs J, Kosek E, Wideman T, Hasenbring MI, Koltyn K, et al. Exercise-Induced Hypoalgesia in Pain-Free and Chronic Pain Populations: State of the Art and Future Directions. *J Pain.* 2019; 20(11):1249-66.
16. Kuphal KE, Fibuch EE, Taylor BK. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. *J Pain.* 2007; 8(12):989-97.
17. Mazzardo-Martins L, Martins DF, Marcon R, Dos Santos UD, Speckhann B, Gadotti VM, et al. High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. *J Pain.* 2010; 11(12):384-93.
18. George S Metsios GS, Moe RH, Kitas DG. Exercise and inflammation. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2020; 34(2):101504.

19. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The antiinflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11:607-15.
20. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports.* 2015; 1-72.
21. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol.* 2012; 2(2):1143-211.
22. Kelly RS, Kelly MP, Kelly P. Metabolomics, physical activity, exercise and health: A review of the current evidence. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020; 1866(12):165936.
23. van Lien R, Goedhart A, Kupper N, Boomsma D, Willemsen G, de Geus EJ. Underestimation of cardiac vagal control in regular exercisers by 24-hour heart rate variability recordings. *Int J Psychophysiol.* 2011; 81:169-76.
24. Flynn MG, McFarlin BK. Toll-like receptor 4: link to the anti-inflammatory effects of exercise? *Exerc Sport Sci Rev.* 2006; 34:176-81.
25. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008; 88:1379-406.
26. Shimojo G, Joseph B, Shah R, Consolim-Colombo FM, De Angelis K, Ulloa L. Exercise activates vagal induction of dopamine and attenuates systemic inflammation. *Brain Behav Immun.* 2019; 75:181-91.
27. 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.

28. Ludtke DD, Siteneski A, Galassi TO, Buffon AC, Cidral-Filho FJ, Reed WR, et al. High-intensity swimming exercise reduces inflammatory pain in mice by activation of the endocannabinoid system *Scand J Med Sci Sports*. 2020; 30(8):1369-78.
29. Belmonte LAO, Martins TC, Salm DC, Emer AA, de Oliveira BH, Mathias K, et al. Effects of different parameters of continuous training and high-intensity interval training in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I. *J Pain*. 2018; S1526-5900(18)30327-4.
30. Brüggemann TR, Ávila LC, Fortkamp B, Greiffo FR, Bobinski F, Mazzardo-Martins L, et al. Effects of Swimming on the Inflammatory and Redox Response in a Model of Allergic Asthma. *Int J Sports Med*. 2015; 36(7):579-84.
31. Markworth JF, Cameron-Smith D. Arachidonic acid supplementation enhances in vitro skeletal muscle cell growth via a COX-2-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013; 304(1):C56-67.
32. Gangemi S, Lucioti G, D'Urbano E, Mallamace A, Santoro D, Bellinghieri G, et al. Physical exercise increases urinary excretion of lipoxin A4 and related compounds. *J Appl Physiol* (1985). 2003; 94(6):2237-40.
33. Droste SK, Gesing A, Ulbricht S, Muller MB, Linthorst AC, Reul JM. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology*. 2003; 144:3012-23.
34. Fediuc S, Campbell JE, Riddell MC. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J.Appl.Physiol*. 2006; 100:1867-75.
35. Droste SK, Chandramohan Y, Hill LE, Linthorst AC, Reul JM. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology*. 2007; 86:26-37.

36. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids — new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*. 2005; 353:1711-23.
37. Raja NS, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020; 161(9):1976-82.
38. Kandel ER. *Princípios da neurociências*. 5. ed. Porto Alegre: AMGH; 2014.
39. Wang VC, Mullally WJ. Pain Neurology. *Am J Med*. 2020; 133(3):273-280.
40. Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10(4):283-94.
41. Piel MJ, Kroin JS, van Wijnen AJ, Kc R, Im H-J. Pain Assessment in Animal Models of Osteoarthritis. *Gene*. 2014; 537:184-8.
42. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012; 211:39-50.
43. Salgado, Afonso Shiguemi Inoue. Fisioterapia integrative: como ter saúde em um mundo doente. In: *Terapia manual integrativa nos sistemas de controle da dor*. Londrina: Midiograf; 2019. p. 186.
44. Kosek E, Cohen M, Baron R, Gebhart GF, Mico JA, Rice AS, et al. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain*. 2016; 157:1382-6.
45. Chimenti RL, Frey-Law LA, Sluka KA. A mechanism-based approach to physical therapist management of pain. *Phys Ther*. 2018; 98:302-14.
46. Pogatzki-Zahn EM, Segelcke D, Schug SA. Postoperative pain-from mechanisms to treatment. *Pain Rep*. 2017; 2(2):588.

47. Weiser TG, Regenbogen SE, Thompson KD, Haynes AB, Lipsitz SR, BerryWR, et al. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet*. 2008; 372:139-44.
48. Gerbershagen HJ, Pogatzki-Zahn E, Aduckathil S, Peelen LM, Kappen TH, van Wijck AJ, et al. Procedure-specific risk factor analysis for the development of severe postoperative pain. *Anesthesiology*. 2014; 120:1237-45.
49. Fletcher D, Stamer UM, Pogatzki-Zahn E, Zaslansky R, Tanase NV, Perruchoud C, et al. Chronic postsurgical pain in Europe: an observational study. *Eur J Anaesthesiology*. 2015; 32:725-34.
50. Farr J, Jaggars R, Lewis H, Plackis A, Sim SB, Sherman SL. Evidence-based approach of treatment options for postoperative knee pain. *Phys Sportsmed*. 2014; 42(2):58-70.
51. Furlan AD, Sandoval JA, Mailis-Gagnon A, Tunks E. Opioids for chronic noncancer pain: A meta-analysis of effectiveness and side effects. *CMAJ*. 2006; 174(11):1589-94.
52. Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM, Brennan TJ. Spinal administration of MK-801 and NBQX demonstrates NMDA-independent dorsal horn sensitization in incisional pain. *PAIN* 2005; 114:499-510.
53. Wang Y, Wu J, Guo R, Zhao Y, Zhang M, Chen Z, et al. Surgical incision induces phosphorylation of AMPA receptor GluR1 subunits at Serine-831 sites and GluR1 trafficking in spinal cord dorsal horn via a protein kinase C α -dependent mechanism. *Neuroscience*. 2013; 240:361-70.
54. Pogatzki EM, Raja SN. A mouse model of incisional pain materials and methods. *Anesthesiology*. 2003; 99:1023-7.
55. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *PAIN*. 1996; 64:493-501.

56. Sahbaie P, Li X, Shi X, Clark JD. Roles of Gr-1 leukocytes in postincisional nociceptive sensitization and inflammation. *Anesthesiology*. 2012; 117:602-12.
57. Carreira EU, Carregaro V, Teixeira MM, Moriconi A, Aramini A, Verri WA, et al. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. *Eur J Pain*. 2013; 17:654-63.
58. Jang JH, Liang D, Kido K, Sun Y, Clark DJ, Brennan TJ. Increased local concentration of complement C5a contributes to incisional pain in mice. *J Neuroinflammation*. 2011; 8:80.
59. Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ. Characterization of adelta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *J Neurophysiol* 2002; 87:721-31.
60. Kang S, Lee D, Theusch BE, Arpey CJ, Brennan TJ. Wound hypoxia in deep tissue after incision in rats. *Wound Repair Regen* 2013; 21:730-9.
61. Brennan TJ. Pathophysiology of postoperative pain. *PAIN*. 2011; 152:S33.
62. Xu J, Brennan TJ. Guarding pain and spontaneous activity of nociceptors after skin versus skin plus deep tissue incision. *Anesthesiology*. 2010; 112:153-64.
63. Kuprash DV, Nedospasov SA. Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation. *Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81(11):1237-9.
64. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014; 2014:149185.
65. Norling LV, Serhan CN. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *J Intern Med*. 2010; 268(1):15-24.

66. Peter Libby. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007; 65(2):140-6.
67. Scott A, Khan KM, Cook JL, Duronio V. What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br J Sports Med.* 2004; 38(3):248-9.
68. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : receptors, functions, and roles in disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138(4): 984-1010.
69. Dreamstime.com. Inflamação e reparo tecidual [internet]. Acesso 23 de julho de 2021. Disponível em: <https://pt.dreamstime.com/ilustra%C3%A7%C3%A3o-stock-inflama%C3%A7%C3%A3o-e-reparo-do-tecido-image62002173>.
70. Neto AO, Costa CMC, Siqueira JTT e colaboradores. Dor: Princípios e Práticas. In: Ferreira SH, Ferrari LF, Cunha TM, Nascimento PGBD, Junior WAV e Cunha FQ. Dor inflamatória. Porto Alegre: Artmed; 2009. p. 265-79.
71. Jones HR, Robb CT, Perretti M, Rossi AG. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol.* 2016; 28(2):137-45.
72. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11:519-31.
73. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* 2010; 2:216-27.
74. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med.* 2013; 5(5):661-74.

75. Markworth JF, Maddipati KR, Cameron-Smith D. Emerging roles of pro-resolving lipid mediators in immunological and adaptive responses to exercise-induced muscle injury. *Exerc Immunol Rev.* 2016; 22:110-34.
76. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in immunology.* 2015; 27:200-15.
77. Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev.* 2016; 273(1):357-70.
78. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood.* 2012; 120:60-72.
79. Samuelsson B. Role of basic science in the development of new medicines: Examples from the eicosanoid field. *J Biol Chem.* 2012; 287:10070-80.
80. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2001; 2:612-9.
81. Bannenberg G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801:1260-73.
82. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity.* 2014; 40:315-27.
83. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 2007; 21:325-32.
84. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* 2016; 15(8):551-67.

85. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol*. 2016; 6(2):603-21.
86. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 2000; 21:55-89.
87. Buckingham JC, Solito E, John C, Tierney T, Taylor A, Flower R, et al. Annexin 1: a paracrine/juxtacrine mediator of glucocorticoid action in the neuroendocrine system. *Cell Biochem Funct*. 2003; 21(3):217-21.
88. Perretti M, D'acquistio F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(1):62-70.
89. Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 275(1-2):71-8.
90. Da Silva JPV. Estudo do papel da proteína induzida por glicocorticóide Anexina A1 na resolução da resposta inflamatória aguda[dissertação]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
91. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(6):449-61.
92. Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res*. 2004; 53: (4):125-32.
93. Gobbetti T, Cooray SN. Annexin A1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. *Biol Chem*. 2016; 397(10):981-93.
94. Perucci LO, Sugimoto MA, Gomes KB, Dusse LM, Teixeira MM, Sousa LP. Annexin A1 and specialized proresolving lipid mediators: promoting resolution as

- a therapeutic strategy in human inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2017; 21(9):879-96.
95. Grewal T, Hoque M, Conway JRW, Reverter M, Wahba M, Beevi SS, et al. Annexin A6-A multifunctional scaffold in cell motility. *Cell Adh Migr*. 2017; 11(3):288-304.
 96. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*. 2002; 82:331-71.
 97. D'Acunto CW, Gbelcova H, Festa M, Ruml T. The complex understanding of annexin A1 phosphorylation. *Cell Signal*. 2014; 26:173-8.
 98. Buckingham JC, John CD, Solito E, Tierney T, Flower RJ, Christian H et al. Annexin 1, glucocorticoids, and the neuroendocrine-immune interface. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1088:396-409.
 99. Brancaleone V, Mitidieri E, Flower RJ, Cirino G, Perretti M. ANXA1 mediates hydrogen sulfide properties in the control of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014; 351(1):96-104.
 100. Vago JP, Nogueira CR, Tavares LP, Soriani FM, Lopes F, Russo RC, et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2012; 92(2):249-58.
 101. Souza DG, Fagundes CT, Amaral FA, Cisalpino D, Sousa LP, Vieira AT, et al. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunol*. 2007; 179:8533-43.
 102. Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LP. Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance. *J Immunol Res*. 2016; 2016:8239258.

103. Damazo AS, Yona S, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. *J Immunol*. 2006; 176(7):4410-8.
104. Gimenes AD, Andrade TR, Mello CB, Ramos L, Gil CD, Oliani SM. Beneficial effect of annexin A1 in a model of experimental allergic conjunctivitis. *Exp Eye Res*. 2015; 134:24-32.
105. McArthur S, Gobbetti T, Kusters DH, Reutelingsperger CP, Flower RJ, Perretti M. Definition of a novel pathway centered on lysophosphatidic acid to recruit monocytes during the resolution phase of tissue inflammation. *J Immunol*. 2015; 195(3):1139-51.
106. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formylpeptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev*. 2009; 61(2):119-61.
107. Leoni G, Alam A, Neumann PA, Lambeth JD, Cheng G, McCoy J, et al. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J Clin Invest*. 2013; 123(1):443-54.
108. Cattaneo F, Guerra G, Ammendola R. Expression and signaling of formyl-peptide receptors in the brain. *Neurochem Res*. 2010; 35(12): 2018-26.
109. John CD, Sahni V, Mehet D, Morris JF, Christian HC, Perretti M, et al. Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH secretion: targets for annexin A1, lipoxins, and bacterial peptides. *FASEB J*. 2007; 21(4):1037-46.
110. Fung-Yih Ho C, Ismail NB, Kong-Ze Koh J, Gunaseelan S, Low Y, Ng Y, et al. Localisation of Formyl-Peptide Receptor 2 in the Rat Central Nervous System and Its Role in Axonal and Dendritic Outgrowth. *Neurochem Res*. 2018; 43(8):1587-98.

111. Migeotte I, Communi D, Parmentier M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17(6):501-19.
112. Vieira AM, Neto EH, Figueiredo CC, Barja Fidalgo C, Fierro IM, Morandi V. ATL-1, a synthetic analog of lipoxin, modulates endothelial permeability and interaction with tumor cells through a VEGF-dependent mechanism. *Biochem Pharmacol.* 2014; 90(4):388-96.
113. Perretti M, Chiang N, La M, Fierro IM, Marullo S, Getting SJ, et al. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat Med.* 2002; 8:1296-302.
114. Filep JG, Sekheri M, El Kebir D. Targeting formyl peptide receptors to facilitate the resolution of inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2018; 833:339-48.
115. Waechter, V. Role of the lipoxin A4 receptor in inflammation [dissertation]. Zurich: Faculty of Science; 2010.
116. Shao G, Zhou H, Zhang Q, Jin Y, Fu C. Advancements of Annexin A1 in inflammation and tumorigenesis. *Onco Targets Ther.* 2019; 12:3245-54.
117. Gao Y, Chen Y, Xu D, Wang J, Yu G. Differential expression of ANXA1 in benign human gastrointestinal tissues and cancers. *BMC Cancer.* 2014; 14:520.
118. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson MG. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 1985; 100:126-31.
119. Stults-Kolehmainen MA, Sinha R. The effects of stress on physical activity and exercise. *Sports Med.* 2014;44(1):81-121. doi: 10.1007/s40279-013-0090-5.

120. Brum PC, Forjaz CLM, Tinucci T, Negrão CE. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Rev Paul Educ Fís.* 2004; 18(1):21-31.
121. Stranahan AM, Lee K, Mattson MP: Central mechanisms of HPA axis regulation by voluntary exercise. *Neuromolecular Med.* 2008;10(2):118-127.
122. Duclos M, Tabarin A. Exercise and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Front Horm Res.* 2016; 47:12-26.
123. Sapolsky RM, Romero M, Munck AU: How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000; 21:55-89.
124. Chen YW, Lin MF, Chen YC, Hung CH, Tzeng JI, Wang JJ: Exercise training attenuates postoperative pain and expression of cytokines and N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in rats. *Reg Anesth Pain Med.* 2013; 38:282-8.
125. Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of grown factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 2007; 30(9):467-72.
126. Hohmann AG, Suplita RL. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* 2006; 8(4):693-708.
127. Thorén P, Floras JS, Hoffmann P, Seals DR. Endorphins and exercise: Physiological mechanisms and clinical implications. *Med Sci Sports Exerc.* 1990; 22(4):417-28.
128. Ross LM, Porter RR, Durstine JL. High-intensity interval training (HIIT) for patients with chronic diseases. *J Sport Health Sci.* 2016; 5(2):139-144.
129. Cox ER, Gajanand T, Burton NW, Coombes JS, Coombes BK. Effect of different exercise training intensities on musculoskeletal and neuropathic pain in

inactive individuals with type 2 diabetes - Preliminary randomised controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020; 164:108168.

130. Jung ME, Bourne JE, Little JP. Where does HIT fit? An examination of the affective response to high-intensity intervals in comparison to continuous moderate- and continuous vigorous-intensity exercise in the exercise intensity-affect continuum. *PLoS One.* 2014; 9(12):e114541.
131. Astorino TA, Allen RP, Roberson DW, Jurancich M, Lewis R, McCarthy K: Attenuated RPE and leg pain in response to short-term high-intensity interval training. *Physiol Behav.* 2012; 105:402-7.
132. Hamed NS, Raoof NALA. Effect of high intensity interval training on diabetic obese women with polyneuropathy: a randomized controlled clinical trial. *Phys Ther Rehabil.* 2014; 1:4.
133. O'Leary TJ, Collett J, Howells K, Morris MG: High but not moderate-intensity endurance training increases pain tolerance: a randomised trial. *Eur J Appl Physiol.* 2017; 117:2201-10.
134. Junior LFF, Browne RAV, Frazão DT, Dantas TCB, Silva PHM, Freitas RPA, et al. Effect of Low-Volume High-Intensity Interval Exercise and Continuous Exercise on Delayed-Onset Muscle Soreness in Untrained Healthy Males. *J Strength Cond Res.* 2019; 33(3):774-82.
135. Kodesh E, Weissman-Fogel I. Exercise-induced hypoalgesia - interval versus continuous mode. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014; 39(7):829-34.
136. Da Silva FOC, Macedo DV. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.* 2011; 13(4):320-8.
137. Dumont N, Frenette J. Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery in vivo and in vitro: a mechanism partly dependent on

- the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *Am J Pathol.* 2010; 176(5):2228-35.
138. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007; 204(5): 1057-69.
 139. Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol.* 2012; 189(7):3669-80.
 140. Bizzarro V, Belvedere R, Dal Piaz F, Parente L, Petrella A. Annexin A1 Induces Skeletal Muscle Cell Migration Acting through Formyl Peptide Receptors. *PLoS One.* 2012; 7(10):e48246.
 141. Bizzarro V, Fontanella B, Franceschelli S, Pirozzi M, Christian H, Parente L, et al. Role of Annexin A1 in mouse myoblast cell differentiation. *J Cell Physiol.* 2010; 224(3):757-65.
 142. Bizzarro V, Petrella A, Parente L. Annexin A1: novel roles in skeletal muscle biology. *J Cell Physiol.* 2012; 227(8):3007-15.
 143. D'Acquisto F, Perretti M, Flower RJ. Annexin-A1: A pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol.* 2008; 155(2):152-69.
 144. Röhrig B, du Prel JB, Wachtlin D, Blettner M. Types of study in medical research: part 3 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int.* 2009; 106(15):262-8.
 145. Kilkenney C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* 2010; 8(6): e1000412.

146. Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: Eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim.* 2011;45(1):1-13.
147. Wayne DW. *Biostatistics: A foundation for analysis in the health. Sciences.* 9 edition. 2008.
148. Martins DF, Siteneski A, Ludtke DD, Dal-Secco D, Santos ARS. High-intensity swimming exercise decreases glutamate-induced nociception by activation of G-protein-coupled receptors inhibiting phosphorylated protein kinase A. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(7):5620-31.
149. Martins DF, Brito RN, Stramosk J, Batisti AP, Madeira F, Turnes BL, et al. Peripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. *J Neurosci Res.* 2015; 93(1):157-66.
150. Vieira C, Salm DC, Horewicz VV, Ludtke DD, Emer AA, Koerich JF, et al. Electroacupuncture decreases inflammatory pain through a pro-resolving mechanism involving the peripheral annexin A1-formyl peptide receptor 2/ALX-opioid receptor pathway. *Pflugers Arch.* 2021; 473(4):683-95.
151. Horewicz VV, Crestani S, de Sordi R, Rezende E, Assreuy J. FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. *Eur J Pharmacol.* 2015; 746:267-73.
152. 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; 72:248-54.

153. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots *Anal Biochem*. 2010; 401(2):318-20.
154. Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LG, et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience*. 2011; 194:337-48.
155. Martins DF, Turnes BL, Cidral-Filho FJ, Bobinski F, Rosas RF, Danielski LG, et al. Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. *Neuroscience*. 2016; 324:485-95.
156. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983; 16(2):109-10.
157. CONCEA. Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Brasília, 3ª ed. 2016. Disponível em: <http://www.invitare.com.br/arq/ceua/Arquivo-3-normativas-concea-2016.pdf>. Acesso em: 26 de agosto de 2019.
158. CFMV. RESOLUÇÃO Nº 1000, DE 11 DE MAIO DE 2012. Disponível em: https://www.feis.unesp.br/Home/comissaodeeticaeusoanimal/resolucao-1000-11-05-2012--cfmv_-eutanasia.pdf. Acesso em: 18 de junho de 2010.

ANEXOS

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



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 4 de dezembro de 2018
Registro na CEUA (código): 18.034.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação da influência do sexo nos efeitos da natação sobre a hiperalgesia em um modelo não clínico de dor pós-operatória: Análise da via ANXA1/FPR2", registrada com o nº 18.034.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - 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 12 de dezembro de 2018.

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

ANEXOS



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
 Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 4 de dezembro de 2018

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação da influência do sexo nos efeitos da natação sobre a hiperalgesia em um modelo não clínico de dor pós-operatória: Análise da via ANXA1/FPR2", registrada com o nº 18.034.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 12 de dezembro de 2018.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1 de janeiro de 2018 a 31 de dezembro de 2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogêneo <i>Mus musculus</i>
Nº de animais	440
Peso/idade	35-45g / 45-60 dias
Sexo	ambos
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC


 Prof. Sandro Melim Sgroff
 Coordenador da Comissão

ANEXOS




Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

1) CADASTRO DE PROTOCOLO Nº: 18.034.2.07.IV

2) TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da influência do sexo nos efeitos da natação sobre a hiperalgesia em um modelo não clínico de dor pós-operatória: Análise da via ANXA1/FPR2

3) PROFESSOR(A) E/OU PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL (EIS):
 Daniel Fernandes Martins

3) ESTUDANTES SOB ORIENTAÇÃO:
 Daniela Dero Lüdtkke

4) AUTOR (ES):
 Daniel Fernandes Martins
 Daniela Dero Lüdtkke

5) DATA DESTES PARECER CONSUBSTANCIADO:
 Tubarão, 03 de dezembro de 2018.

6) LOCAL DE REALIZAÇÃO DA ETAPA EXPERIMENTAL:
 Biotério Experimental do Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEX), campus Pedra Branca. Os procedimentos experimentais serão realizados no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEX).

7) PROJETO FINANCIADO COM FOMENTO INTERNO/EXTERNO:
 Não ☐ Sim ☒

O projeto consta com recursos de capital e custeio de projetos previamente aprovados – FAPESC Chamada Pública 06/2017 e 3414/2012 e CNPq 309407/2017-6 e 476454/2013-1. Em anexo.

UNISUL - Campus Grande Florianópolis,
 Avenida Pedro Branca, 25, Cidade Universitária, CEP 88137-270, Palhoça, SC.
 Fone: (48) 3278-1038 / E-mail: ceua@unisul.br

ANEXOS




Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

8) SUMÁRIO DA PROPOSTA:

O projeto objetiva avaliar a influência do sexo nos efeitos da natação de alta intensidade sobre a hiperalgesia e a via ANXA1/FPR2 submetidos a um modelo não clínico de dor pós-operatória. Serão utilizados um total de 440 camundongos heterogênicos (45 – 60 dias), sendo 220 machos e 220 fêmeas.

O delineamento experimental está dividido em três protocolos denominados de Experimento 1 – utilizando 100 animais, divididos em 5 grupos (n=10 machos e n=10 fêmeas); Experimento 2 – utilizando 240 animais, divididos em 12 grupos (n=10 machos e n=10 fêmeas); e Experimento 3 utilizando 100, divididos em 5 grupos (n=10 machos e n=10 fêmeas). Os animais serão submetidos aos protocolos de natação, mensuração de hiperalgesia mecânica, avaliação de edema e temperatura da pata, teste do campo aberto.

Após o procedimento de MIA, mostras de triceps sural, medula espinal e pele da superfície ventral da pata serão coletadas para análises bioquímicas.

9) OBJETIVOS DO PROJETO:

Apresenta de forma clara e objetiva a ideia central da pesquisa e ações que permitem seu desdobramento. Em anexo.

10) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS:

Título Inadequado ☒ Adequado ☐

Comentários: Clareza no enunciado e coerência com a proposta do projeto.

Introdução ☒ Adequada ☐ Inadequada

Comentários: Apresenta de forma clara, coesa e objetiva o problema a ser estudado e é fundamentada em referencial teórico pertinente e atualizado. Em anexo.

Justificativa Inadequada ☒ Adequada ☐

Comentários: A Justificativa apresentada no Formulário Unificado para Solicitação de Autorização para uso de Animais em Experimentação e/ou Ensino está de acordo com a

UNISUL – Campus Grande Florianópolis,
Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária, CEP 88137-270, Palhoça, SC.
Fone: (48) 3270-1035 / E-mail: ceua@unisul.br

ANEXOS





Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

proposta de estudo e justifica, de forma clara, a necessidade da escolha do modelo animal em questão. Em anexo.

Objetivos Inadequados Comentários: ☒ Adequados ☐ Apresenta de
 forma clara e objetiva a ideia central da pesquisa e ações que
 permitem seu desdobramento. Em anexo.

Cronograma para execução da Proposta Inadequado ☒ Adequado ☐

Comentários: Distribui adequadamente as tarefas de acordo com o tempo previsto. Em anexo.

Orçamento e Fonte Financiadora Inadequado ☒ Adequado ☐

Comentários: Nada digno de nota. Em anexo.

Referências Inadequadas ☒ Adequadas ☐

Comentários: Bibliografia atual e adequada ao tema de pesquisa. Em anexo.

11) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de Invasividade: GIV ☐ GI ☒ GII ☐ GIII ☐

Comentários: Grau de Invasividade GI2 – os procedimentos realizados desencadeiam estresse, uma vez que os animais serão submetidos a ambientes diferentes daqueles em que estão habituados, incluindo o protocolo de natação forçada. Além disso, serão submetidos aos testes de nocicepção.

Espécie: **Número Amostral**

Comentários: Tamanho amostral adequado, estimado a partir de estudos prévios e de acordo com a distribuição dos grupos proposta.

UNISUL - Campus Grande Florianópolis,
 Avenida Park Resende, 28, Florianópolis/SC, CEP 88075-070, Fone: (51) 3361-1000

ANEXOS




Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Redução Amostral: Não ☐ Sim ☒

Comentários: Não aplicável.

Substituição de Metodologia: Não ☐ Sim ☒ metodologia:
 Se achar necessária, justifique e sugira uma nova

Comentários: Não aplicável. Metodologia fundamentada em estudos prévios.

Aprimoramento da Metodologia: Não Se achar ☐ Sim ☒
 necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Comentários: Não aplicável.

Acomodação e manutenção dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada Se
 achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Comentários: Os animais serão alojados no Biotério Experimental do Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEX) e contarão com um período de aclimação desde sua chegada até o início dos procedimentos experimentais. Os procedimentos experimentais serão realizados no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEX).

Manipulação dos animais: Inadequada Se achar ☒ Adequada ☐ inadequada
 cite abaixo as melhorias necessárias:

Comentários: Nada digno de nota.

Analgesia dos animais (se aplicável): Inadequada Se ☒ Adequada ☐ achar
 inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Comentários: Nada digno de nota. Em anexo.

Anestesia dos animais (se aplicável): Inadequada Se ☒ Adequada ☐ achar
 inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

UNISUL - Campus Grande Florianópolis,
 Avenida Pedro Brena, 25, Cidade Universitária, CEP 88137-270, Palhoça, SC.
 Fone: (48) 3279-1038 / E-mail: ceua@unisul.br

ANEXOS




Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Comentários: Nada digno de nota. Em anexo.

Ponto final humanitário: Inadequados Se achar ☒ Adequados ☐ inadequada
cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Comentários: Há observância Res. Normativa 23, de 23 de julho de 2015 do CONCEA. Em anexo.

Eutanásia dos animais (se aplicável): Inadequada ☒ Adequada ☐
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Comentários: Há a observância do procedimento de Morte Indolor Assistida/Sacrifício, segundo as disposições da resolução nº 1000, de 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV, do Guia de Boas Práticas para Eutanásia do CFMV, da Res. Normativa 37 de 15/02.2018 do CONCEA além dos dispostos na DBCA vigente. O procedimento será realizado por médico veterinário.

12) A PROPOSTA ESTÁ ADEQUADA À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Inadequada ☐ Adequada ☒

Comentários: Não há pendências ao nível institucional.

13) RECOMENDAÇÃO:

☒ Aprovada
☐ Com Pendência(s)
☐ Não aprovada
☐ Retirada

Comentários gerais referentes à Proposta:

UNISUL - Campus Grande Florianópolis,
Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária, CEP 68137-270, Palhoça, SC.
Fone: (48) 3279-1036 / E-mail: ceua@unisul.br

ANEXOS

 CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais	 UNISUL
Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)	
Prezados Pesquisadores, o projeto atende aos critérios solicitados pela CEUA e legislação vigente.	
Conclusões e/ou Itens de Pendência:	
Não foram encontradas pendências éticas na proposta apresentada.	
 <u>Embasamento Jurídico:</u>	
Lei Federal 11.794 de 08/10/2008 e Decreto nº 6.899/2009, de 15/07/2009;	
Resolução nº 1000, de 11/05/2012 – CFMV;	
Instruções Normativas nº1 à 38 do CONCEA;	
Resolução CONSUN/UNISUL nº 380/2017, de 30/08/2017.	

ANEXOS

ANEXO B – Produção científica publicada durante o período do Doutorado

- Ano 2017

Mol Neurobiol
DOI 10.1007/s12035-016-0095-9



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

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

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

Abstract Several studies in humans have reported that improved pain control is associated with exercise in a variety of painful conditions, including osteoarthritis, fibromyalgia, and neuropathic pain. Despite the growing amount of experimental data on physical exercise and nociception, the precise mechanisms through which high-intensity exercise reduces pain remain elusive. Since the glutamatergic system plays a major role in pain transmission, we firstly analyzed if physical exercise could be able to decrease glutamate-induced nociception through G-protein-coupled receptor (G-PCR) activation. The second purpose of this study was to examine the effect of exercising upon phosphorylation of protein kinase A

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

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

Introduction

ANEXOS

- Ano 2017

Hindawi
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2017, Article ID 2378973, 9 pages
<https://doi.org/10.1155/2017/2378973>

Research Article

Foot Reflexotherapy Induces Analgesia in Elderly Individuals with Low Back Pain: A Randomized, Double-Blind, Controlled Pilot Study

Bruna Hoffmann de Oliveira,¹ Anna Quialheiro de Abreu da Silva,^{2,3} Daniela Dero Ludtke,^{2,4} Fernanda Madeira,² Graciela Mendonça da Silva Medeiros,¹ Rodolfo Borges Parreira,⁵ Afonso Shiguemi Inoue Salgado,^{4,5} Luiz Augusto Oliveira Belmonte,^{2,4} Francisco José Cidral-Filho,⁴ and Daniel F. Martins^{1,2,4}

¹Naturopathy Graduate Course, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, SC, Brazil

²Physiotherapy Graduate Course, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, SC, Brazil

³Postgraduate Program in Public Health, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

⁴Experimental Neuroscience Laboratory, Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, SC, Brazil

⁵School of Postural and Manual Therapy, Salgado Institute of Integral Health, Londrina, PR, Brazil

Correspondence should be addressed to Daniel F. Martins; danielmartinsfisio@hotmail.com

Received 1 July 2017; Revised 5 September 2017; Accepted 20 September 2017; Published 29 November 2017

Academic Editor: Shu-Ming Wang

ANEXOS

- Ano 2018

Journal of Neuroscience Methods 308 (2018) 192–196



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth



Short communication

A non-reflexive method based on the variability of temperature and bioimpedance in measuring inflammatory hyperalgesia and analgesia in mice



Felipe Reitz^a, Daiana C. Salm^{a,b}, Daniela Dero Ludtke^a, Aureo dos Santos^{a,b}, Jefferson Traebert^b, Daniel F. Martins^{a,b,*}

^a Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina at Palhoça, Santa Catarina, Brazil

^b Postgraduate Program of Health Sciences, University of Southern Santa Catarina at Palhoça, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Behavioral test
Inflammatory pain
Pain measurements
Thermography

ABSTRACT

Background: Preclinical studies measure withdrawal responses to evoking thermal and mechanical stimuli instead of the more clinically important spontaneous pain.

New method: Therefore, we studied the effect of peripheral inflammation induced by intraplantar administration of complete Freund's adjuvant (CFA) in mice on the variability of temperature and bioimpedance as an index of pain produced by inflammation. To this end, we initially determined mathematical scores based on changes in temperature and bioimpedance (STB) for animals with an inflamed paw and compared these scores with commonly used measures of inflammatory pain. We then pharmacologically validated the tool using dexamethasone.

Results: The STB analysis resembled the response found in the von Frey Hair (vFH) test. The CFA-induced increase in STB and vFH tests were reversed by intraperitoneal administration of dexamethasone. The correlation between the STB and vFH measurements showed a high correlation coefficient ($R^2 = 0.911$, $p < 0.001$).

Comparison with existing method: Our results also demonstrated that CFA paw injection induced mechanical hyperalgesia in mice and remained virtually unaltered during all time-points tested for 5 days, as measured with

ANEXOS

- Ano 2018

Accepted Manuscript

Original Research Article

Far infrared-emitting ceramics decrease Freund's adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in mice through cytokine modulation and activation of peripheral inhibitory neuroreceptors

Ralph Fernando Rosas, Aline Armiliato Emer, Ana Paula Batisti, Daniela Dero Ludtke, Bruna Turnes Lenfers, Franciane Bobinski, Francisco José Cidral-Filho, Daniel Fernandes Martins

PII: S2095-4964(18)30084-0
 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.08.002>
 Reference: JOIM 52

To appear in: *Journal of Integrative Medicine*

Received Date: 12 December 2017

Accepted Date: 22 June 2018

Please cite this article as: R.F. Rosas, A.A. Emer, A.P. Batisti, D.D. Ludtke, B.T. Lenfers, F. Bobinski, F.J. Cidral-Filho, D.F. Martins, Far infrared-emitting ceramics decrease Freund's adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in mice through cytokine modulation and activation of peripheral inhibitory neuroreceptors, *Journal of Integrative Medicine* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.08.002>



ANEXOS

- Ano 2018

Accepted Manuscript

Dietary supplementation with procyanidin-rich *Pinus pinaster* extract is associated with attenuated Ehrlich tumor development in mice

Isabela Machado Barbosa David, Flávia de Souza Fernandes, Juliana Barreto dos Santos Silva Ferreira, Daniela Dero Lüdtkke, Daniel Fernandes Martins, Franciane Bobinski, Thiago Bezerra Gaspar Carvalho da Silva, Luiza Daux Buffon, Maria Biatriz Rodrigues Kopper, Gustavo Silveira da Silva, Rodrigo Costa Zeferino, Rozangela Curi Pedrosa, Maicon Roberto Kviecinski



PII: S0271-5317(17)31044-8

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.005>

Reference: NTR 7960

To appear in: *Nutrition Research*

Received date: 13 November 2017

Revised date: 28 August 2018

Accepted date: 8 November 2018

Please cite this article as: Isabela Machado Barbosa David, Flávia de Souza Fernandes, Juliana Barreto dos Santos Silva Ferreira, Daniela Dero Lüdtkke, Daniel Fernandes Martins, Franciane Bobinski, Thiago Bezerra Gaspar Carvalho da Silva, Luiza Daux Buffon, Maria Biatriz Rodrigues Kopper, Gustavo Silveira da Silva, Rodrigo Costa Zeferino, Rozangela Curi Pedrosa, Maicon Roberto Kviecinski, Dietary supplementation with procyanidin-rich *Pinus pinaster* extract is associated with attenuated Ehrlich tumor development in mice. *Ntr* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.005>

ANEXOS

- Ano 2018

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology
<https://doi.org/10.1007/s00424-018-2203-3>

CORRECTION



Correction to: Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I

Leidiane Mazzardo-Martins^{1,2} · Daiana Cristina Salm^{1,2} · Elisa C. Winkelmann-Duarte¹ · Júlia Koerich Ferreira² · Daniela Dero Lüdtke^{2,3} · Kamilla Pamplona Frech¹ · Luiz Augusto Oliveira Belmonte^{2,3} · Verônica Vargas Horewicz^{2,3} · Anna Paula Piovezan^{2,3} · Francisco José Cidral-Filho^{2,3} · Ari Ojeda Ocampo Moré⁴ · Daniel Fernandes Martins^{2,3}

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Correction to: Pflügers Archiv - European Journal of Physiology
<https://doi.org/10.1007/s00424-018-2192-2>

The original version of this article contains an error. The Author Francisco José Cidral-Filho incorrectly listed as Francisco José Cidra-Filho. The correct spelling is presented above. The original article has been corrected.

ANEXOS

- 2019

ARTICLE IN PRESS

Journal of Bodywork & Movement Therapies xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Bodywork & Movement Therapies

journal homepage: www.elsevier.com/jbmt

Original Research

Effects of core strengthening on balance in university judo athletes

Heloisa Schroeder Martins ^{a,*}, Daniela Dero Lüdtkke ^{a,b}, Júlio César de Oliveira Araújo ^a,
Francisco José Cidral-Filho ^b, Afonso Shiguemi Inoue Salgado ^{b,c}, Frederic Viseux ^d,
Daniel Fernandes Martins ^{a,b}

^a Physical Therapy Graduate Program, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, Santa Catarina, Brazil

^b Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx) and Health Sciences Postgraduate Program, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil

^c Integrative Physical Therapy Residency Program - Philadelphia University Center, Londrina, PR, Brazil

^d Laboratory of Industrial and Human Automation Control, Mechanical Engineering and Computer Sciences (LAMIH), Polytechnic University of Hauts-de-France and Center for Assessment and Treatment of Pain (CEID), General Hospital of Valenciennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2019

Accepted 9 May 2019

Keywords:

Balance

Core strengthening

Judo

Baropodometry

Stabilometry

ABSTRACT

Background: Core strengthening prepares the body in an integral, safe and efficient way, favoring balance and postural control; physical abilities constantly demanded in sports, especially in body contact modalities, such as Judo. **Objective:** This study investigated the effects of core strengthening on balance in university judo athletes.

Methods: Eighteen athletes from the University of Southern Santa Catarina (UNISUL) were randomly allocated into two groups: experimental ($n = 9$) and control ($n = 9$). Experimental group athletes were submitted to a core strengthening protocol (30-min sessions, twice a week for 5 consecutive weeks). Evaluations consisted of Stabilometric (center of pressure behavior parameters: total area in mm^2 , laterolateral and anteroposterior width in mm) and baropodometric analysis [peak pressure: obtained during a 30-s acquisition period and expressed by foot area, i.e., (a) forefoot (metatarsal heads and toes); and (b) hindfoot (calcaneus region, distal third of the foot)]. Right/left foot ratios were calculated as relative percentages and used for the analysis. The analyzes were performed at baseline and after 5 weeks of core strengthening. The athletes were evaluated in two situations: eyes-open and eyes-closed. **Results:** Total right/left foot ratio pressure, right/left fore and hindfoot ratio pressure, as well as anteroposterior width measurements were statistically smaller in the experimental group.

ANEXOS

- 2019



Article

Manual Therapy Reduces Pain Behavior and Oxidative Stress in a Murine Model of Complex Regional Pain Syndrome Type I

Afonso S. I. Salgado ^{1,2}, Juliana Stramosk ², Daniela D. Ludtke ^{2,3}, Ana C. C. Kuci ², Daiana C. Salm ^{2,3}, Lisandro A. Ceci ^{2,3}, Fabricia Petronilho ⁴, Drielly Florentino ⁴, Lucineia G. Danielski ⁴, Aline Gassenferth ⁵, Luana R. Souza ⁶, Gislaine T. Rezin ⁷, Adair R. S. Santos ^{5,6} , Leidiane Mazzardo-Martins ⁶, William R. Reed ⁷  and Daniel F. Martins ^{1,2,*}

¹ Coordinator of Integrative Physical Therapy Residency–Philadelphia University Center, Londrina 86020-000, Paraná, Brazil

² Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina, Palhoça 88137-270, Santa Catarina, Brazil

³ Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça 88137-270, Santa Catarina, Brazil

⁴ Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão 88704-900, Santa Catarina, Brazil

⁵ Laboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, University Federal of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Santa Catarina, Brazil

⁶ Postgraduate Program in Neuroscience, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Santa Catarina, Brazil

⁷ Department of Physical Therapy, School of Health Professions, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294-1212, USA

* Correspondence: daniel.martins4@unisul.br; Tel.: +55-(48)-3279-1144

Received: 2 July 2019; Accepted: 8 August 2019; Published: 10 August 2019



ANEXOS

- 2019

Randomized Controlled Trial > Altern Ther Health Med. 2019 Nov;25(6):34-43.

Antioxidant Effect of Far Infrared Radiation Produced by Bioceramics in Individuals with Intermittent Claudication: A Randomized, Controlled Pilot Study

Fábio Goulart da Silva, Gerli Elenise Gehrke Herr, Francisco José Cidral-Filho, Fabricia Petronilho, Lucineia Gainski Danielski, Drielly Florentino, Franciane Bobinski, Daniela Dero Ludtke, Cintia Vieira, Daniel Fernandes Martins, Eliane Roseli Winkelmann

PMID: 32006455

Abstract

Background: Biomedical research has recently incorporated bioceramics applications into new health care approaches.

Objective: This study evaluated the effect of far infrared-emitting bioceramics wraps in the treatment of intermittent claudication.

Methods: This is a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. Thirty-five patients met the criteria and were randomized into either control (placebo wraps) or bioceramics group (far infrared emitting-ceramics wraps) and assessed over a 90-day period for the following outcomes: six-

ANEXOS

- 2020

Received: 4 October 2019 | Revised: 8 March 2020 | Accepted: 15 April 2020
DOI: 10.1111/sms.13705



ORIGINAL ARTICLE

WILEY

High-intensity swimming exercise reduces inflammatory pain in mice by activation of the endocannabinoid system

Daniela D. Ludtke¹ | Aline Siteneski^{1,2} | Taynah de Oliveira Galassi¹ |
Alexandre Carlos Buffon¹ | Francisco José Cidral-Filho¹ | William R. Reed³ |
Afonso Shiguemi Inoue Salgado⁴ | Adair R.S. dos Santos⁵ | Daniel F. Martins¹

¹Experimental Neuroscience Laboratory, Post-Graduate Program of Health Sciences, University of Southern of Santa Catarina, Palhoça, Brazil

²Instituto de investigación, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador

³Department of Physical Therapy, School of Health Professions, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA

⁴Coordinator of Integrative Physical Therapy Residency – Philadelphia University Center, Londrina, Brazil

⁵Laboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, University Federal of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

As exercise intervention solely for pain reduction is relatively new, the available research still leaves an incomplete picture of responsible mechanisms and pathways. Nonetheless, evidence indicates that exercise-induced analgesia involves activation of the endocannabinoid (eCB) system. The present study investigated the role of the eCB system on the antihyperalgesic effect of high-intensity swimming exercise (HISE) in an animal model of peripheral persistent inflammation. Male Swiss mice were allocated to non-exercised and exercised groups and subjected to subcutaneous intraplantar injection (i.pl.) of a single dose of complete Freund's adjuvant (CFA) to induce inflammatory pain. Cumulative HISE was performed once a day, and mechanical hyperalgesia and edema were evaluated 0.5 hour after HISE for seven consecutive days. To investigate the role of the eCB system on the antihyperalgesic effect of HISE, non-exercised and exercised mice received intraperitoneal (ip), intrathecal (i.t.) or i.pl. injections of vehicle, AM281 (a CB₁ cannabinoid receptor antagonist) or AM630 (a CB₂ cannabinoid receptor antagonist) from the 3rd to

ANEXOS

- 2020

Journal of Neuroimmunology 348 (2020) 577360

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim




Balneotherapy decreases mechanical hyperalgesia by reversing BDNF and NOS2 immunocontent in spinal cord of mice with neuropathic pain

Rômulo Nolasco de Brito^{a,b}, Daniela D. Ludtke^{a,b}, Bruna Hoffmann de Oliveira^{a,b},
 Taynah de Oliveira Galassi^{a,b}, Paula Franson Fernandes^{a,b}, Sarah Van Den Berge^a,
 Afonso Shiguemi Inoue Salgado^{a,b,c}, Francisco José Cidral-Filho^{a,b}, Verônica Vargas Horewicz^{a,b},
 Franciane Bobinski^{a,b}, Daniel Fernandes Martins^{a,b,*}

^a Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil

^b Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil

^c Integrative Physical therapy Residency, Centro Universitário Filadélfia, Londrina, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Balneotherapy
 Chronic pain
 Immersion therapy
 Thermalism
 Sciatic nerve injury

ABSTRACT

In the last decades, balneotherapy or thermalism has been used for health promotion and in the treatment of inflammatory and chronic processes. We found that balneotherapy reduced mechanical hyperalgesia, as well the increase of BDNF and NOS2 levels in the spinal cord, while increased BDNF and NOS1 in the paw. The data presented herein demonstrated for the first time in a murine model of neuropathic pain, the analgesic effect of balneotherapy with the water from the natural springs of Santo Amaro da Imperatriz-Brazil. Nevertheless, future clinical trials should be conducted to test the effectiveness of balneotherapy in neuropathic pain patients.

ANEXOS

- 2020

Journal of Neuroimmunology 340 (2020) 577145



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim



Lavandula angustifolia essential oil inhalation reduces mechanical hyperalgesia in a model of inflammatory and neuropathic pain: The involvement of opioid and cannabinoid receptors

Nathalia Nahas Donatello^{a,b}, Aline Armiliato Emer^{a,b}, Daiana Cristina Salm^{a,b}, Daniela Dero Ludtke^{a,b}, Silvana Aparecida Strapazzon Ribeiro Bordignon^b, Júlia Koerich Ferreira^b, Afonso Shiguemi Inoue Salgado^{a,b,c}, Dalila Venzke^d, Lizandra C. Bretanha^d, Gustavo A. Micke^d, Daniel F. Martins^{a,b,*}

^a Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina 88137-270, Brazil

^b Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEX), University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina 88137-270, Brazil

^c Integrative Physical Therapy Residency Program, Philadelphia University Center, Londrina, PR, Brazil

^d Department of Chemistry, Center of Physical and Mathematical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Aromatherapy
Neuropathic pain
Inflammatory pain
Opioid system
Cannabinoid system

ABSTRACT

Lavandula angustifolia (LaEO) essential oil has been widely used by aromatherapy in the treatment of various clinical conditions, with evidence of its analgesic and anti-inflammatory potential. Our results demonstrate that sixty-five substances were identified in LaEO. Among the compounds found, the major ones were linalool (30.61%) and linalyl acetate (20.36%). We found that LaEO inhalation reduces mechanical hyperalgesia in conditions of chronic inflammatory and neuropathic pain. Furthermore, this effect seems to be mediated by peripheral and central opioid and cannabinoid 2 receptors. The findings of the present study suggests that the LaEO inhalation is effective on the chronic pain treatment.

ANEXOS

- 2021

> [Pflugers Arch.](#) 2021 Apr;473(4):683-695. doi: 10.1007/s00424-020-02502-1. Epub 2021 Jan 20.

Electroacupuncture decreases inflammatory pain through a pro-resolving mechanism involving the peripheral annexin A1-formyl peptide receptor 2/ALX-opioid receptor pathway

Cintia Vieira ^{1 2}, Daiana C Salm ^{1 2}, Verônica V Horewicz ^{1 2}, Daniela D Ludtke ^{1 2}, Aline A Emer ^{1 2}, Júlia F Koerich ^{1 2}, Gustavo Mazzardo ¹, Sayron Elias ¹, Ari O O Moré ³, Leidiane Mazzardo-Martins ^{1 4}, Francisco J Cidral-Filho ^{1 2}, William R Reed ^{5 6}, Anna Paula Piovezan ^{1 2}, Daniel F Martins ^{7 8}

Affiliations [+](#) expand

PMID: 33474635 DOI: 10.1007/s00424-020-02502-1

Abstract

The pro-resolving mechanism is a recently described endogenous process that controls inflammation. The present study evaluated components of this mechanism, including annexin 1 (ANXA1) and the formyl peptide receptor 2/ALX (FPR2/ALX) receptor, in the antihyperalgesic effect induced by