

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**RAFAELA SILVA DOS SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E  
CÉLULAS DA GLIA NA DOR MUSCULAR CONTROLADA PELO EXERCÍCIO  
FÍSICO**

Alfenas/MG  
2016

**RAFAELA SILVA DOS SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E  
CÉLULAS DA GLIA NA DOR MUSCULAR CONTROLADA PELO EXERCÍCIO  
FÍSICO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG.

Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor.

Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Santos, Rafaela Silva dos.

Investigação da participação do sistema endocanabinóide e células da glia na dor muscular controlada pelo exercício físico. / Rafaela Silva dos Santos. -- Alfenas/MG, 2016.  
100f.

Orientador: Giovane Galdino de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Mialgia. 2. Exercício. 3. Receptor de Canabinóide. 4. Micróglia.  
I. Souza, Giovane Galdino de. II. Título.

CDD-612

RAFAELA SILVA DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E  
CÉLULAS DA GLIA NA DOR MUSCULAR CONTROLADA PELO  
EXERCÍCIO FÍSICO

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG.  
Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor.

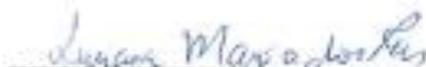
Aprovada em: 23/ 03/ 2016

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Assinatura

Profª Drª. Luciana Maria dos Reis  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Assinatura

Profª. Drª. Maria Rita Rodrigues  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Assinatura

*Aos meus pais Fátima e Luiz Carlos e a minha Voía, com todo meu amor.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, o Senhor Soberano da minha vida, pelo dom da sabedoria, paciência nos momentos difíceis, por estar sempre presente nos meus caminhos.

À minha Nossa Senhora, por nunca me desamparar, por sempre ter me colocado debaixo do seu manto sagrado, mesmo nos momentos de desespero.

Ao meu orientador Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza, pela brilhante orientação, paciência, pelos conhecimentos infinitos, por ter me dado a oportunidade de realizar meu sonho que é ser uma brilhante cientista. Por ter me ensinado que ainda é possível acreditar no SER HUMANO. Ele é meu exemplo de caráter, profissional, cientista e acima de tudo um SER HUMANO excepcional.

À Família Buscapé, Tia, Valdimir, Mi, Aninha, Filipe, Júlio, Dinho, Iara, Gu, Bela, Nenzinho, João, Victor, Diego, Karla, Fio Dri, Gabriel, Gui, Padrinho, Cléu, Dudu e Nando pelas orações, por sempre ter me apoiado e acreditado no meu potencial e nos meus sonhos.

À minha amada Voía, pelo exemplo que é na minha vida, por nunca ter me abandonado, pelas vezes que foi comigo apenas de companhia no laboratório no Natal, Ano Novo, Carnaval, mesmo sem saber sobre o meu trabalho, sempre disse com muito orgulho..."A minha neta trabalha com os ratinhos!!!!"

Aos meus pais, por muitas vezes, terem deixado de realizarem seus sonhos para que os meus fossem concretizados.

Aos meus irmãos Juninho e Rany pela confiança.

Ao meu amor Fabrilucio, por desde o primeiro ter acreditado e me apoiado em todas as minhas decisões, por estar presente em todos os momentos...te amo!

Aos meus amores, Raul, Clara, Mel e Mário pelo amor incondicional e pela doçura que vejo todos os dias nos seus olhares. Em especial à Sasha que foi um ser iluminado que Deus mandou para eu cuidar, para eu amar e que agora se tornou uma estrela!!!!

À Família Insetos: Pedro, Júlia e Fred por terem se tornado essenciais na minha vida, pelas risadas, pelas lágrimas, foi muito mais fácil com a ajuda de vocês. Eu não existo longe de vocês, trabalhar nunca foi tão divertido. O que temos para hoje é SAUDADE...amo para sempre!!!

À família que ganhei no ano de 2014 na Clínica de Fisioterapia, Ieda, Cris, Vera, Meyre, Gisnay, Danilo e Maicon pelos momentos de alegria que se tornaram inesquecíveis. Vocês são muito especiais para mim!

Ao meu grande amigo e irmão Fernando pelo apoio incondicional, pelas orações e pela torcida mesmo de longe pela minha vitória. Amo você!

Ao Prof. Alexandre e a Fabiana pelos conhecimentos compartilhados e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia por terem me acolhido tão bem, em especial, Vanessa Veronesi, Tatiane, Layla, Mara, Ana Laura, Ana Cláudia, Silvia, Clarice e Luciana pelos sorrisos sinceros...

À minha querida amiga e irmã Mel, por ter dividido comigo os melhores e piores momentos desta jornada...amo você!

Ao meu companheiro Herick, por sempre ter sido o meu braço direito em tudo que fiz durante meu Mestrado e por ter se tornado meu irmão.

Aos amigos da Pós, Isabela, Jádina, Roberta, Marília, Ravena, em especial a Jú e o Ricardo por sempre terem me socorrido em sua casa e por serem estas pessoas tão iluminadas que Deus colocou na minha vida.

Aos funcionários Dona Zélia e Helena, aos técnicos José Reis, Marina, Luís e Luciana e a secretária Antonieta por sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos animais, por terem doado suas vidas para a realização deste trabalho.

À UNIFAL, CAPES E FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma fizeram parte deste projeto!!!

*“É necessário sempre acreditar que o sonho é possível,  
que o céu é o limite e você é imbatível”.*

*“Não espere o futuro mudar tua vida, porque o futuro é a consequência do presente.”*

*(Racionais MC's)*

## RESUMO

A dor muscular afeta cerca de 11 a 24% da população mundial. É de origem multifatorial, podendo ser causada por fatores físicos, emocionais, psicológicos e sociais e é cada vez mais encontrada na prática clínica. Estudos tem demonstrado que o exercício físico é uma atividade que auxilia no controle da dor. Os receptores canabinóides do tipo 2 (CB<sub>2</sub>), expressos em tecidos periféricos e células inflamatórias, parecem estar envolvidos no controle da dor. Além disso, estudos tem demonstrado que tais receptores também estejam expressos no Sistema Nervoso Central, incluindo células microgлияis. Sendo assim, o presente estudo investigou a participação de receptores CB<sub>2</sub> e o envolvimento da micrógлия espinal no controle da dor muscular por meio do exercício físico. Para isso, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, pesando entre 20 a 25g. O limiar nociceptivo foi avaliado pelo teste de filamentos de Von frey e pelo teste da placa quente. O modelo de dor muscular foi induzido pela injeção intramuscular de carragenina no músculo gastrocnêmio direito. Para verificar os níveis de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , foi realizado o ensaio de ELISA. A dor muscular pode gerar inflamação com aumento da temperatura local, sendo assim, utilizamos a técnica de termografia para verificar as alterações na temperatura local dos animais. Foram utilizadas as drogas, AM630, para investigar a participação de receptores CB<sub>2</sub>; o MAFP, para avaliar a participação de endocanabinóides e a minociclina, para investigar o envolvimento da micrógлия. Após a terceira semana de natação, os animais apresentaram uma redução da alodínia mecânica e da hiperalgesia térmica induzidas pela carragenina i.m. O AM630, reverteu a antinocicepção induzida pelo exercício, em ambos os testes nociceptivos. O MAFP inibiu a nocicepção muscular nos animais exercitados, apenas no teste da placa quente. A minociclina bloqueou a nocicepção apenas nos animais sedentários com dor muscular. Os resultados do ensaio de ELISA demonstraram que o exercício reduziu os níveis de TNF- $\alpha$ , os quais se encontraram aumentados nos animais com dor muscular que não foram exercitados. Já os níveis basais de IL-1 $\beta$  apresentaram reduzidos apenas nos animais submetidos ao modelo de dor muscular e que realizaram o treinamento físico. Por meio da análise termográfica, foi encontrado uma redução da temperatura local nos animais exercitados com dor muscular. A micrógлия parece estar envolvida na

termorregulação local dos animais com dor muscular exercitados, pois quando a micróglia foi bloqueada pela minociclina, a temperatura corporal nestes animais foi aumentada. Sendo assim, concluímos que o exercício inibe a dor muscular induzida pela carragenina, os receptores CB<sub>2</sub> participam deste controle da dor e a micróglia parece estar envolvida na gênese e manutenção da dor muscular, com a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

**Palavras-chave:** Mialgia. Exercício. Receptor de canabinóide. Micróglia.

## ABSTRACT

Muscle pain affects approximately 11-24% of the population. It is of multifactorial origin, which may be caused by physical, emotional, psychological and social factors and is increasingly found in clinical practice. Studies have shown that physical exercise is an activity that helps to control pain. Cannabinoid receptor type 2 (CB<sub>2</sub>) expressed in peripheral tissues and inflammatory cells, appear to be involved in pain control. In addition, studies have shown that these receptors are also expressed in the central nervous system, including microglial cells. Thus, the present study investigated the participation of CB<sub>2</sub> receptors and the involvement of the spinal microglia in the control of muscle pain by exercise. For this, were used C57BL/6 female mice, weighing between 20 and 25g. The nociceptive threshold was measured by Von Frey filaments test and hot plate test. The muscular pain model was induced by intramuscular injection of carrageenan in the right gastrocnemius muscle. To verify the levels of pro-inflammatory cytokines, we performed the ELISA assay. Muscle pain can lead to inflammation with increased local temperature, so we use thermography technique to check for changes in the local temperature of the animals. The following drugs were used, AM630, to investigate the involvement of CB<sub>2</sub> receptors, MAFP to evaluate the role of endocannabinoids and minocycline to investigate the role of microglia. After the third week of swimming, the animals showed a reduction in mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by carrageenan i.m. The AM630, reversed the antinociception induced by exercise in both nociceptive tests. MAFP inhibited muscle nociception in animal exercised only in the hot plate test. Minocycline blocked nociception only in the sedentary animals with muscular pain. The results of the ELISA assay showed that exercise reduced TNF- $\alpha$  levels, which were found in animals with increased muscle pain, which have not been exercised. Baseline levels of IL-1 $\beta$  showed reduced only in animals submitted to muscular pain model and underwent physical training. By thermographic analysis, we find a reduction in the local temperature of trained animals with muscular pain. Microglia appear to be involved in thermoregulation location of animal muscle pain exercised because when the microglia were blocked by minocycline, body temperature was increased in these animals. Thus, we conclude that exercise inhibits muscle pain induced by carrageenan, CB<sub>2</sub> receptors participate in this pain

control and microglia seems to be involved in the genesis and maintenance of muscle pain, with the release of pro-inflammatory cytokines.

**Keywords:** Myalgia. Exercise. Cannabinoid receptor. Microglia.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Via ascendente da nocicepção.....	28
<b>Figura 2-</b>	Camundongo da linhagem C57BL/6 .....	44
<b>Figura 3-</b>	Via de administração intratecal. ....	46
<b>Figura 4-</b>	Local de injeção da carragenina: músculo gastrocnêmio.....	46
<b>Figura 5-</b>	Teste de Von Frey filamento: .....	50
<b>Figura 6-</b>	Aparato utilizado para o teste da hiperalgesia térmica: Placa quente. ....	51
<b>Figura 7-</b>	Termovisor FLIR Série T420 (Flir System AB, Suécia) .....	52
<b>Figura 8-</b>	Posicionamento do animal sobre a bancada para o registro das imagens termográficas dos membros inferiores. ....	52
<b>Figura 9-</b>	Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico. Os animais receberam carragenina ou veículo antes do início do protocolo de treinamento físico e AM630 ou veículo após o treinamento. ....	54
<b>Figura 10-</b>	Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico. Os animais receberam carragenina ou veículo antes do início do protocolo de treinamento físico e MAFP ou veículo após o treinamento.. ....	55
<b>Figura 11-</b>	Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico. Os animais receberam carragenina ou veículo antes do início do protocolo de treinamento físico e minociclina ou veículo após o treinamento.....	55
<b>Figura 12-</b>	Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico e efeito das citocinas sobre a dor muscular.....	56
<b>Figura 13-</b>	Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico e efeito do exercício sobre o controle da temperatura no modelo de dor muscular.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Protocolo de exercício físico (natação) .....	48
--	----

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Efeito do exercício físico na dor muscular. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana..... 59
- Gráfico 2-** Efeito do exercício físico na dor muscular. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.. ..... 59
- Gráfico 3-** Participação do receptor para canabinóide (CB<sub>2</sub>) sobre o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício físico no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo Von frey filamentos antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana. .... 61
- Gráfico 4-** Participação do receptor para canabinóide (CB<sub>2</sub>) sobre o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício físico no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana. .... 61
- Gráfico 5-** Participação dos endocanabinóides no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo Von Frey filamentos antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana. .... 62
- Gráfico 6-** Participação de endocanabinóides no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana. .... 63
- Gráfico 7-** Participação da micróglia no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo Von Frey filamentos antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana..... 64
- Gráfico 8-** Participação da micróglia no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.. ..... 65

<b>Gráfico 9–</b>	Efeito dos veículos sobre o teste do Von Frey filamentos. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste do Von Frey filamentos antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.....	66
<b>Gráfico 10–</b>	Efeito dos veículos sobre o teste da placa quente. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana. ....	66
<b>Gráfico 11–</b>	Efeito do treinamento físico sobre os níveis musculares de TNF- $\alpha$ . Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis de TNF- $\alpha$ (pg/mL) realizados após a última semana de exercício físico.. ....	69
<b>Gráfico 12–</b>	Efeito do treinamento físico sobre os níveis musculares de IL-1 $\beta$ . Os dados representam a média + E.P.M. dos níveis de IL-1 $\beta$ (pg/mL) realizados após a última semana de exercício físico.. ....	69
<b>Gráfico 13–</b>	<b>A-</b> Efeito do treinamento físico sobre a temperatura corporal após dor muscular. <b>B-</b> Imagens representativas da temperatura local no músculo gastrocnêmio direito em animais sedentários e exercitados. ....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>μL</b>	- Microlitros
<b>AM 630</b>	- Antagonista do receptor para canabinóide do tipo 2
<b>ATP</b>	- Trifosfato de Adenosina
<b>CB<sub>1</sub></b>	- Receptor para canabinóide do tipo 1
<b>CB<sub>2</sub></b>	- Receptor para canabinóide do tipo 2
<b>CDME</b>	- Corno Dorsal da Medula Espinal
<b>CFA</b>	- Adjuvante Completo de Freud
<b>Cg</b>	- Carragenina
<b>CGRP</b>	- Proteína relacionada ao gene da calcitonina
<b>CR3</b>	- Receptor para o complemento-3
<b>CR3/CD11b</b>	- Marcador microglial
<b>Crem</b>	- Cremofor
<b>CX3CR1</b>	- Quimiocina fractalcina
<b>DAGL</b>	- Enzima diacilglicerol lipase
<b>DMSO</b>	- Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
<b>ELISA</b>	- <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>EPM</b>	- Erro padrão da média
<b>Ex</b>	- Exercício
<b>FAAH</b>	- Ácido graxo amino hidrolase
<b>G</b>	- Gramas
<b>GFAP</b>	- Proteína ácida fibrilar glial
<b>i.m.</b>	- Intramuscular
<b>i.p.</b>	- Intraperitoneal

<b>i.t.</b>	- Intratecal
<b>IBA</b>	- Marcador microglial
<b>IL-1</b>	- Interleucina 1
<b>IL-10</b>	- Interleucina 10
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	- Interleucina 1 beta
<b>IL-4</b>	- Interleucina 4
<b>K<sup>+</sup></b>	- Potássio
<b>M</b>	- Molar
<b>MAFP</b>	- Ácido metil araquidonil fluorfosfano/ (5Z, 8Z, 11Z, 14Z) 5,8, 11, 14-eicosatetraenil-metil ester fosfofluorídrico)
<b>MB</b>	- Medida basal
<b>MGL</b>	- Monoacilglicerol lipase
<b>MHC</b>	- Complexo principal de histocompatibilidade
<b>Mino</b>	- Minociclina
<b>nM</b>	- Nanômetro
<b>NMDAR</b>	- Receptor de glutamato
<b>NO</b>	- Óxido nítrico
<b>PAG</b>	- Substância Cinzenta Periaquedutal
<b>PBS</b>	- Tampão Fosfato Salino
<b>PG</b>	- Prostaglandina
<b>PGE</b>	- Prostaglandina E
<b>pH</b>	- Potencial hidrogeniônico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	- Ácido ribonucléico mensageiro
<b>RVM</b>	- Bulbo rostral ventro medial
<b>s.c.</b>	- Subcutânea

- Sal** - Salina
- SDCR tipo I** - Síndrome de Dor Complexa Regional do tipo 1
- Sed** - Sedentário
- SNC** - Sistema Nervoso Central
- SNP** - Sistema Nervoso Periférico
- SP** - Substância P
- TLRs** - *Toll like receptors*
- TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>26</b>
2.1	DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	26
2.2	CLASSIFICAÇÃO DA DOR .....	28
2.3	DOR MUSCULAR.....	30
2.4	EXERCÍCIO FÍSICO: NATAÇÃO .....	31
2.5	SISTEMA ENDOCANABINÓIDE .....	33
2.6	CÉLULAS DA GLIA E NOCICEPÇÃO .....	35
2.7	ATIVAÇÃO GLIAL E A MODULAÇÃO DA DOR.....	38
2.8	CB <sub>2</sub> E GLIA.....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1	ANIMAIS.....	44
4.3	ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS .....	45
<b>4.3.1</b>	<b>Administração Intratecal.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Injeção intramuscular.....</b>	<b>46</b>
4.4	EXERCÍCIO FÍSICO.....	47
4.5	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO .....	49
<b>4.5.1</b>	<b>Teste de alodínia mecânica: Von Frey filamentos .....</b>	<b>49</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Teste de hiperalgesia térmica: Placa quente .....</b>	<b>50</b>
4.6	TERMOGRAFIA .....	51
4.7	PREPARAÇÃO DOS TECIDOS E DOSAGEM DE CITOCINAS PELO ENSAIO DE ELISA .....	53
<b>4.7.1</b>	<b>ELISA- <i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i> .....</b>	<b>53</b>
4.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	54
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
5.1	EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A DOR MUSCULAR INDUZIDA PELA CARRAGENINA. ....	58

5.2	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PARACANABINÓIDE DO TIPO 2 (CB <sub>2</sub> ) NO CONTROLE DA DOR MUSCULAR PELO EXERCÍCIO FÍSICO .....	60
5.3	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE ENDOCANABINÓIDES NO CONTROLE DA DOR MUSCULAR PELO EXERCÍCIO FÍSICO. ....	61
5.4	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA MICROGLIA NO CONTROLE DA DOR MUSCULAR PELO EXERCÍCIO FÍSICO.....	63
5.5	EFEITO DOS VEÍCULOS SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO DE RETIRADA DA PATA .....	65
5.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO POR ELISA .....	67
5.7	EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA TEMPERATURA CORPORAL APÓS DOR MUSCULAR.....	69
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>81</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dor é um fenômeno que afeta todas os indivíduos, independente de raça, cor, sexo ou idade, em alguma fase de sua vida. Apesar de todos avanços obtidos nos últimos anos em relação ao entendimento dos mecanismos envolvidos na transmissão dos impulsos dolorosos, muitos tratamentos, principalmente os farmacológicos, não são totalmente eficazes, ou ainda muitos indivíduos sofrem com os efeitos adversos provenientes desses tratamentos.

Diante disso, destaca-se os tratamentos não-farmacológicos, os quais são economicamente viáveis e produzem menos efeitos colaterais. Dentre os não-farmacológicos, o exercício físico é citado como sendo bem eficaz. Estudos demonstram que o exercício físico exerce muitos benefícios para a saúde física e mental, reduz a incidência de patologias, promove neuroproteção, neuroplasticidade, melhora a cognição, além de ter atividade antidepressiva e ansiolítica (MAZZARDO-MARTINS et al., 2010). Além de todas essas vantagens, o exercício promove analgesia (MAZZARDO-MARTINS et al., 2010).

Muitas evidências demonstram que o exercício físico é uma ferramenta útil para o controle da dor. Tais, são utilizados para reabilitar pacientes com doenças crônicas, principalmente com disfunções músculo-esqueléticas, como fibromialgia, dor lombar crônica e dor miofascial (GOWANS; HUECK, 2004; WRIGHT; SLUKA, 2001). Além disso, vários estudos demonstraram que esse efeito ocorre tanto durante quanto após sua prática (KOLTYN, 2000; O'CONNOR; COOK, 1999).

Dentre os vários sistemas envolvidos no controle da dor durante a atividade física, o sistema endocanabinóide tem fundamental importância em termos de relevância fisiológica (FIELD, et al., 2005). Estudos demonstram que os endocanabinóides produzem efeitos antinociceptivos em regiões espinais e supraespinais (DI MARZO et al., 1998; PIOMELLI, 2003). Além disso, Galdino e colaboradores (2014) demonstraram que a administração em ratos de antagonistas para o receptor para canabinóide do tipo 1 (CB<sub>1</sub>) e receptor para canabinóide do tipo 2 (CB<sub>2</sub>), bloqueou a antinocicepção induzida por exercício aeróbico. Em adição, esses autores demonstraram que os níveis plasmáticos de endocanabinóides (anandamida e 2-araquidonoilglicerol) e de mediadores relacionados com a

anandamida (palmitoiletanolamida e oleoiletanolamina) foram aumentados após o exercício aeróbico.

Outros estudos também demonstraram o aumento dos níveis de anandamida na circulação sistêmica em humanos após exercício em esteira e bicicleta (SPARLING et al., 2003).

As células da glia, principalmente a micróglia, são importantes na gênese da dor. Os receptores canabinóides do tipo 2 são expressos em células da glia de humanos e ratos (ASHTON *et al.*, 2006; NUNEZ *et al.*, 2004) e sua expressão aumenta especialmente as células gliais durante a inflamação (RAMIREZ et al., 2005; SHENG et al., 2005;).

Os endocanabinóides atuam sobre os receptores CB2 nas células da glia e inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e NO (CABRAL et al., 2001; MOLINA-HOLGADO et al., 1997; 2002; PUFFENBARGER et al., 2000; SHAOHAMI et al., 1997;), levando a antinocicepção.

Sendo assim, estudos demonstram que receptores CB2 inibem a atividade microglial, por reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (MERIGUI et al., 2012).

Portanto, o presente estudo investigou o envolvimento de receptores CB2 e da micróglia no controle da dor muscular promovida pelo exercício físico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Os tópicos a seguir, apresentarão o embasamento teórico e contextualizações referentes ao estudo.

### 2.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A dor é uma experiência sensitiva e emocional associada ao dano tecidual real ou potencial ou à descrição desses danos (IASP, 2008). Além disso, a dor também é um processo cognitivo que depende de memória, aspectos culturais e psíquicos (LOESER; TREEDE, 2008).

Em indivíduos saudáveis, a dor é utilizada para propósitos altamente adaptáveis, orientada para a sobrevivência. O primeiro objetivo da dor é de avisar de perigo real ou iminente de danos corporais, tais como contato com objetos pontiagudos ou aquecidos (WATKINS; MAIER, 2002).

O segundo objetivo da dor é de encorajar comportamentos de recuperação em resposta à dor resultante do próprio organismo. A lesão já ocorreu e a área danificada é agora inflamada. A informação dolorosa é retransmitida para os centros superiores do cérebro que organizam os comportamentos de recuperação apropriados para proteger e facilitar a cicatrização do local danificado. Tais comportamentos incluem desuso e proteção de um membro lesado e em caso de animais, ocorre a limpeza da lesão com o comportamento de “lamber” (WATKINS; MAIER, 2002).

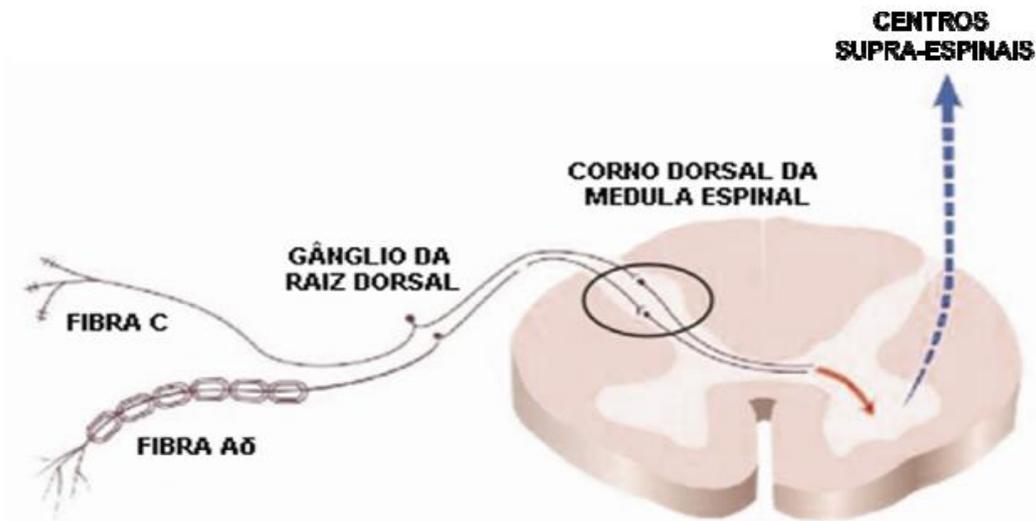
Assim sendo, a dor envolve aspectos comportamentais, podendo causar reações emocionais negativas e, quando persistente, pode tornar-se debilitante e muitas vezes causadora de sofrimento, sendo frequentemente responsável pela diminuição drástica da qualidade de vida dos portadores deste sintoma (CHAPMAN; GAVRIN, 1999; COMPTON; DOERING, 2006; GRIFFIS; JULIUS; BASBAUM, 2001). Já em modelos experimentais de dor em animais é registrado também o processo de codificação e processamento do estímulo nocivo (processo sensorial), sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam na percepção

final da dor (processo emocional), por esta razão, denominamos a resposta comportamental dos animais de nocicepção (LOESER; TREEDE, 2008).

Entretanto, existe uma diferença conceitual quando se utiliza os termos nocicepção e dor. O primeiro conceito consiste apenas na recepção e decodificação do estímulo nocivo por estruturas altamente especializadas do sistema nervoso chamados nociceptores. Essas estruturas consistem em terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias (carreiam estímulo nociceptivo da periferia à medula) com características distintas (limiar de ativação e sensibilidade) em relação a outras estruturas nervosas sensoriais. Entre essas fibras aferentes temos as do tipo C e A $\delta$ , que possuem um menor calibre e estão relacionadas à transdução e condução do estímulo nocivo, vale ressaltar que as fibras C são amielinizadas (ausência de mielina, uma camada de revestimento rica em lipídios e proteínas que possuem nódulos de Ranvier o qual, proporcionam aumento da velocidade do estímulo pela fibra) e as fibras A $\delta$  apresentam mielina e possuem uma maior velocidade de condução do impulso nervoso em relação à fibra C (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Na medula espinal, essas fibras aferentes primárias fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, que por sua vez, ascendem a áreas supra-espinais por meio de tratos neuronais específicos, como por exemplo, o trato espinotalâmico. Assim, os neurônios de segunda ordem farão no tálamo uma segunda sinapse com neurônios de terceira ordem, os quais enviarão a informação nociceptiva até as áreas específicas do córtex cerebral, onde aspectos como intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, proporcionando a percepção da dor (VANDERAH, 2007).

Figura 1- Via ascendente da nocicepção.



Nota: Os axônios das fibras aferentes primárias (C e Aδ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula espinal, onde neurônios de segunda ordem repassam a informação para os tratos neuronais ascendentes.

Fonte: Adaptado de Longhi-Balbinot (2009)

Sendo assim, veremos adiante as formas de classificação da dor.

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO DA DOR

Dentre as formas de classificação da dor, a mais habitualmente utilizada é a que leva em consideração o tempo de duração. Assim sendo, a dor pode ser classificada em aguda e crônica.

A dor aguda se dá pela ativação direta de nociceptores, estruturas especializadas na detecção de estímulos nocivos capazes ou não de causar alguma lesão. Desta forma, muitas vezes a dor aguda pode se estabelecer sem que ocorra uma lesão aparente. Quando a dor persiste por semanas ou meses, é classificada como dor crônica. A dor crônica muitas vezes permanece mesmo após a recuperação da lesão e caracteriza-se também pela incapacidade de o organismo restabelecer suas funções fisiológicas (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999). Na maioria dos casos de dor crônica, ocorrem várias alterações no organismo que

facilitam a transmissão e manutenção dessa dor como, por exemplo, o aumento da síntese e/ou liberação de neurotransmissores, alterações sinápticas e o brotamento de novas fibras nervosas (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999).

A dor pode também ser classificada dependendo de onde ela se origina. A dor nociceptiva é aquela que ocorre devido a uma ativação excessiva de nociceptores, que são estruturas especializadas sensíveis a estímulos nocivos (mecânicos, térmicos e químicos) localizados principalmente na pele, músculos e vísceras, enquanto que a dor neurogênica ocorre quando o tecido neuronal é lesionado com consequente liberação de neuropeptídeos que induzem à dor, tanto por estímulo periférico como central (MILLAN, 1999).

A dor neuropática é aquela que ocorre após uma lesão ou disfunção do sistema nervoso somatossensorial. Ainda fazendo parte desta classificação, pode-se citar a dor psicogênica ou de origem psicológica, que é aquela que ocorre sem a presença de um fator somático identificável (MILLAN, 1999).

Já, a dor inflamatória ocorre em resposta à lesão de tecidos e a resposta inflamatória subsequente. Ocorrem mudanças para a proteção do organismo contra um estímulo nocivo potencialmente prejudicial que causou o dano. Para auxiliar na cura e reparação da parte do organismo atingido, o sistema nervoso sensorial sofre uma profunda mudança na sua capacidade de resposta; normalmente estímulos inócuos agora produzem dor e respostas a estímulos nocivos são exageradas e prolongadas (JUHL et al., 2008). A sensibilidade permanece aumentada no interior da área inflamada e em áreas adjacentes não inflamadas como um resultado de plasticidade em nociceptores periféricos e vias nociceptivas centrais (HUANG et al., 2006; HUCHO; LEVINE, 2007; WOOLF; SALTER, 2000). Uma vez que a via nociceptiva é sensibilizada após a inflamação, os nociceptores já não atuam apenas como detectores para os estímulos nocivos, mas também podem ser ativados por baixos limiares. Normalmente, a dor inflamatória desaparece após a resolução da lesão tecidual inicial (DARFEUILLE-MICHAUD et al., 2004).

Um dos tipos de dor inflamatória que encontramos na clínica é a dor muscular que veremos a seguir.

## 2.3 DOR MUSCULAR

A dor muscular é desencadeada pela ativação dos nociceptores periféricos que acionam fibras nervosas mielínicas A $\delta$  e fibras C do sistema nervoso periférico (SNP), que se projetam nos neurônios segmentares da substância cinzenta do corno dorsal da medula espinal (CDME) que são acionados e sensibilizados e onde mecanismos modulatórios podem inibir ou facilitar a atividade dos nociceptores (MENSE, 1994; 1997; WALL; GUTNICK, 1974).

O que normalmente no dia a dia provoca a dor muscular?

Em modelos animais, o processo miosítico resultante da injeção de agente irritantes musculares, como a carragenina, acarreta a liberação de substâncias vasoativas como a serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas, resultando em aumento da atividade dos nociceptores e de outros receptores. As vias nociceptivas liberam retrogradamente substância P, calcitonina e neuroquinina, as quais agravam a condição inflamatória original. Além disso, a ativação dos nociceptores (via fibras IV) é responsável por gerar a dor muscular (TEIXEIRA, 1999).

Em adição, alguns desses nociceptores são ativados por uma grande variedade de estímulos nociceptivos (ZIMMERMANN, 1988), onde alguns reagem mais intensamente a alguns agentes químicos e outros com atividade polimodal. Tais nociceptores são sensibilizados por substâncias algio gênicas incluindo a bradicinina, a histamina, os íons K<sup>+</sup>, as prostaglandinas (PGE), serotonina, acidose tecidual (pH inferior a 6,1) e substância P (SP). A liberação de noradrenalina e de prostaglandinas (PGs) pelas fibras simpáticas que inervam os músculos também podem modificar a atividade dos receptores (MENSE et al., 1977; MENSE, 1997; TEIXEIRA, 1999).

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas. Ela se apresenta como uma reação complexa a vários agentes nocivos, como microrganismos e células danificadas, que consiste de respostas vasculares, migração, ativação de leucócitos e reações sistêmicas (TROWBRIDGE; EMLING, 1998), sendo considerada uma resposta fisiológica desencadeada por lesão tecidual ou estímulos antigênicos e que muitas vezes pode ser prejudicial ao organismo (RAO et al., 2007; SCHMID-SCHONBEIN, 2006;). Clinicamente, a

inflamação caracteriza-se por apresentar cinco sinais cardinais: eritema, edema, calor, dor e perda da função (HEIDLAND et al., 2006), os quais são provenientes da dilatação de arteríolas e aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores inflamatórios. Além disso, com o aumento da temperatura, as reações metabólicas ocorrem com maior rapidez e liberam calor adicional. Já o edema surge com aumento da permeabilidade vascular (VERGNOLLE, 2008).

Sabe-se que o exercício físico influencia no controle da dor muscular. Sendo assim, falaremos a seguir sobre o efeito do exercício físico na dor.

## 2.4 EXERCÍCIO FÍSICO: NATAÇÃO

Exercício físico é toda atividade física planejada, estruturada e repetitiva que tem por objetivo a melhora ou manutenção da aptidão física (CASPERSEN et al., 1985), apesar do estresse fisiológico à homeostase e aos processos sistêmicos biológicos que exigem solicitações energéticas acima do nível de repouso (MAUGHAN et al., 2000).

O exercício físico é um importante componente no controle da dor, sendo utilizado no tratamento de diversas disfunções músculo-esqueléticas crônicas (BEMENT; SLUKA, 2005).

Nesse contexto, evidências demonstram que o exercício físico é um componente que auxilia no controle de algumas condições dolorosas (WRIGHT; SLUKA, 2001). Este fenômeno é tipicamente conhecido como analgesia induzida pelo exercício, mas a terminologia mais adequada para este fenômeno é hipoalgesia induzida pelo exercício (KOTYN, 2002).

A natação é uma das formas de exercício físico mais praticada em todo o mundo, sendo que nos Estados Unidos é a segunda modalidade de exercício dinâmico mais popular, ficando atrás somente da caminhada (BOOTH et al., 1997; US CENSUS BUREAU, 2009).

Essa modalidade de exercício tem a vantagem de oferecer uma carga mínima sobre as articulações, permitindo uma grande facilidade de movimento. Além disso, a natação apresenta menor estresse mecânico devido à flutuação, pela redução dos

efeitos da gravidade, bem como uma melhor redistribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos (CAMPION, 2000).

Em roedores, a natação é considerada uma habilidade inata. Estudos demonstram ocorrências de adaptações (sessões de natação de 20 minutos com suporte de cargas de 5, 6, 7, 8, 9 ou 10% ao peso do corpo durante 6 semanas consecutivas) ao treinamento físico iguais às observadas em humanos (GOBATTO et al., 2001).

Os protocolos de exercício são usados na reabilitação de pacientes com doenças musculoesqueléticas crônicas tais como: fibromialgia, lombalgia crônica e dor miofascial (DE HUECK, 2004; GOWANS; WRIGHT; SLUKA, 2001). Além disso, vários investigadores relataram que uma sessão de exercício é capaz de alterar a percepção dolorosa, tanto durante quanto após a realização da mesma (COOK, 1999; KOLTYN, 2000; O'CONNOR, 1999).

Muitos estudos em humanos e animais demonstram que o exercício aeróbio proporciona alívio da mesma, denominado analgesia induzida por exercício, podendo ser ativado por uma variedade de estímulos dolorosos, incluindo o calor (JANAL et al., 1984; 1994) e frio (PADAWER; LEVINE, 1992). Vários estudos foram realizados visando demonstrar a analgesia induzida pelo exercício, bem como fatores isolados que influenciam a sua ocorrência e extensão (DROSTE et al., 1991; KEMPPAINEN et al., 1985).

Além disso, estudos investigando o efeito do treinamento com natação em roedores demonstraram uma melhora transitória da alodínia em casos de injúria medular (HUTCHINSON et al., 2004), redução da hiperalgesia (BEMENT; SLUKA, 2005), diminuição da atrofia muscular durante o período de denervação por esmagamento do nervo ciático (JAWEED et al., 1974), aumento da síntese e liberação de serotonina no córtex cerebral, tronco encefálico e medula espinal (DEY et al., 1992).

Outro estudo demonstrou que o exercício físico agudo de intensidade leve promoveu uma redução da hiperalgesia frente a estímulo químico induzida pela formalina e da hiperalgesia térmica avaliado pelo teste da placa quente (BENTO-SILVA et al., 2010).

Em adição, Bratti e colaboradores (2011) encontraram que o exercício prolongado de alta intensidade diminuiu a hipersensibilidade dolorosa presente em

modelo de síndrome da dor complexa regional tipo I (SDCR tipo I) em camundongos. Kuphal e colaboradores (2007) também demonstraram que a natação reduziu a hipersensibilidade dolorosa encontrada no teste da formalina e a alodínia induzida por lesão nervosa em ratos.

Além disso, estudos evidenciam que o exercício praticado diariamente pode ser uma adição benéfica para tratamentos clínicos e farmacológicos a pessoas portadoras de neuropatia periférica (LI & HONDZINSKI, 2012).

## 2.5 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

Dentre os vários sistemas sugeridos envolvidos no mecanismo da dor, o endocanabinóide tem sido fortemente investigado ao longo das últimas décadas.

O sistema endocanabinóide foi descoberto no final dos anos 80, enquanto que os sistemas de neurotransmissores principais, colinérgico, adrenérgico e dopaminérgico foram descobertos na década de 30. A função básica do sistema canabinóide pode ser protetora. No SNC, a transmissão de sinal dos endocanabinóides é mediada sobretudo pelo receptor CB<sub>1</sub>, um transportador transmembrana de endocanabinóides e enzimas hidrolíticas envolvidas tanto na síntese (lipase diacilglicerol, DAGL, a fosfolipase D específica N-acylphosphatidylethanolamina) como na inativação (hidrolase amida dos ácidos graxos e lipase monoacilglicerol) dos endocanabinóides. Os endocanabinóides são sintetizados à medida que são necessários a partir do ácido araquidônico dos fosfolipídios da membrana. A despolarização neuronal pós-sináptica leva à liberação de endocanabinóides, estes difundem-se ao longo da sinapse e ativam os receptores CB<sub>1</sub> na terminação pré-sináptica (DI MARZO et al., 2004).

A partir de então, ocorreu o desvendamento do primeiro receptor canabinóide, o qual foi descrito como receptor para canabinóide do tipo 1 (CB<sub>1</sub>). Dogrul e colaboradores (2012), demonstraram que estes receptores estão amplamente expressos em diversas estruturas encefálicas, preferencialmente, em áreas do cérebro envolvidas na transmissão da dor, tais como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), bulbo rostral ventromedial (RVM) e córtex, bem como na medula espinal, gânglios da raiz dorsal, sistema nervoso entérico, adipócitos, células

endoteliais, hepatócitos, tecido muscular e trato gastrointestinal (HERKENHAM et al., 1990; HOWLETT et al., 2004).

Os endocanabinóides participam em uma variedade de processos incluindo a termorregulação, apetite, função imunitária, percepção (audição, visão e paladar), cognição (potenciação a longo prazo e memória a curto prazo) e função motora (locomoção, propriocepção e tônus muscular) (POPE; PARSONS, 2010). Em muitos estudos, demonstram a participação dos endocanabinóides na modulação da dor, regulação do apetite, alterações de humor e funções patológicas, respostas inflamatórias, câncer, comportamento aditivo e epilepsia (GUINDON; HOHMANN, 2009; YATES; BARKER, 2009). Diferentemente dos neurotransmissores clássicos, os endocanabinóides são considerados mensageiros atípicos, uma vez que medeiam a transferência das informações dos terminais pós aos pré-sinápticos de uma forma retrógrada. Ainda, são sintetizados sob demanda e não são armazenados em vesículas (DI MARZO et al., 2004).

Com novos estudos e investigações desse sistema, Pertwee (2002), Van-Sickle e colaboradores (2005) demonstraram posteriormente um segundo receptor para canabinóide (CB<sub>2</sub>), presentes predominantemente no sistema periférico e se relacionam com o sistema imunológico, células T, células B, baço e amígdalas (AMERI, 1999; MARTIN; LIVHTMAN, 1998). Por consequência, estão intimamente ligados a funções do sistema imune onde regulam a liberação de citocinas e a migração de células do sistema imune, podendo ser encontrados em diversos tecidos linfoides dentro ou fora do SNC (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2007; PERTWEE, 2001). Ensaio de hibridização *in situ* demonstraram a existência de RNAm para os receptores CB<sub>2</sub> no fígado, timo, amígdalas, medula óssea, pâncreas, assim como em macrófagos, monócitos e em uma ampla variedade de células imunes em cultura (LYNN; HERKENHAM, 1994). RNAm para os receptores canabinóides CB<sub>2</sub> também foi encontrado em tecido glial de córtex retirados de ratos recém-nascidos, inclusive em concentrações mais elevadas do que níveis de RNAm para os receptores CB<sub>1</sub> no desenvolvimento cerebral (CABRAL et al., 2001).

Apesar de a maioria dos estudos acreditarem que os receptores CB<sub>2</sub> são exclusivamente expressos em tecidos periféricos e células inflamatórias (MUNRO et al., 1993), agora há cada vez mais provas que sugerem que eles também são expressos no SNC (VAN SICKLE et al., 2005). Na verdade, a alta regulação de CB<sub>2</sub> durante a dor neuropática em modelos animais tem sido descrita em células

microgliais e astrócitos (MARESZ et al., 2005; ZHANG et al., 2003). Além disso, tem sido sugerido que os receptores CB<sub>2</sub> desempenham um papel crucial na regulação imune do SNC durante a dor neuropática (LUONGO et al., 2010; RACZ et al., 2008).

Uma das funções do receptor CB<sub>2</sub> no sistema imunológico durante o processo doloroso é a modulação da liberação de citocinas. A ativação de CB<sub>2</sub> nas células T por endocanabinóides leva à inibição da adenilil ciclase nestas células e a uma redução da resposta ao desafio imunológico (CONDIE et al., 1996).

Outra função é no controle da proliferação, diferenciação e sobrevivência tanto em neurônios como em células não neuronais. Este receptor pode funcionar como um "sinal de diferenciação de células" (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2007), sendo sua expressão aumentada em células gliais durante estados dolorosos (SÁNCHEZ et al., 2001).

Recentemente, tem sido demonstrado que as células microgliais de ratos produzem um número de endocanabinóides ambíguos, anandamida e 2-AG (WALTER et al., 2003). Assim, por meio do papel imunomodulador dos canabinóides, buscou-se compreender melhor como o sistema endocanabinóide regula a função microglial.

## 2.6 CÉLULAS DA GLIA E NOCICEPÇÃO

As células gliais, especificamente os astrócitos e a microglia, foram reconhecidas por longo tempo como constituintes envolvidos em promover o ambiente ideal para o funcionamento neuronal, tendo como funções principais o suporte e a nutrição destas células. No entanto, estudos publicados na última década têm indicado que a glia pode interagir com os neurônios, modulando a sua atividade tanto sob condições fisiológicas quanto patológicas (ARAQUE et al., 1999). A ativação glial é uma característica comum de muitas doenças do sistema nervoso central e está envolvida na defesa, no reparo e na regeneração do tecido neuronal exposto a doenças infecciosas, inflamação, trauma, tumores ou neurodegeneração (KREUTZBERG, 1996; VILA et al., 2001).

Além disso, a ativação glial constitui um processo multidimensional e a maneira pela qual ela é expressa depende do tipo e da intensidade do estímulo

indutor, podendo ocorrer curso temporal e padrão de resposta distintos. Esta característica das células gliais é distinta das células neuronais, cuja ativação é unidimensional, ou seja, resulta exclusivamente em produção de potencial de ação (WATKINS; MAIER, 2003). No sistema nervoso central, os astrócitos e a microglia diferem quanto à origem, ao seu estado de ativação basal e às alterações morfológicas e funcionais após a ativação (WATKINS; MAIER, 2003).

No SNC de mamíferos, as células gliais são até 10 vezes mais numerosas do que os neurônios e podem compreender até 50% do volume total de células (POPE, 2010). Os astrócitos constituem cerca da metade da população total das células gliais e são amplamente divididos em astrócitos protoplasmáticos e em astrócitos fibrosos, com base nos dados nas diferenças morfológicas. Seus processos rodeiam os capilares dos neurônios revestindo as superfícies neuronais de forma livre, formando um sincício com outros astrócitos através de junções de hiato (PETERS et al., 1976). Apesar de seus números e locais estratégicos, há pouca informação disponível quanto às suas funções, embora tenha especulações consideráveis a este respeito (SOMJEN, 1981; VARON; SOMJEN, 1979). Em grande parte, essa falta de informação se deve à ausência de modelos adequados, em que as propriedades dinâmicas de astrócitos podem ser estudados com detalhes. Estudos eletrofisiológicos de astrócitos *in situ* (SOMJEN, 1981; VARON; SOMJEN, 1979), no entanto, mostraram claramente que, ao contrário dos neurônios, e eles são não excitáveis, assim, as suas funções específicas não podem ser identificadas com base em uma única resposta elétrica da mesma maneira como pode ser feito para os neurônios. Os astrócitos exibem funções imunes. Tais células expressam os receptores *toll-like* (TLRs), além de atuarem como células apresentadoras de antígenos e produzem uma variedade de citocinas e quimiocinas, também são importantes para a sinalização do SNC com a periferia, uma vez que, eles secretam quimiocinas e citocinas e apresentam contato íntimo com os vasos sanguíneos (DONG; BENVENISTE, 2001). Um dos marcadores mais utilizados na detecção dos astrócitos são os filamentos intermediários presentes no citoplasma e conhecidos como GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). A função destas proteínas ainda não é conhecida, porém o aumento da sua expressão está associado com o incremento da ativação dos astrócitos (WATKINS; MAIER 2002).

Outra célula da glia bastante importante na gênese da dor é a micróglia. É uma população de macrófagos especializada, encontrada no SNC, são quiescentes

quando estão inativadas. No entanto, depois de lesão do SNC, estas células podem ser ativadas por citocinas produzidas pela infiltração de células efectoras imunitárias. Assim, a estimulação da microglia é um modelo útil para o estudo de mecanismos subjacentes de lesão neuronal por vários fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos lançados pela ativação microglial (JUNG et al., 2010).

Diferente dos astrócitos, sob condições fisiológicas, a micróglia apresenta-se na forma quiescente e constitui as células imunes residentes no sistema nervoso central (KREUTZBERG, 1996). Embora apesar dos poucos estudos consistentes demonstrem a origem da micróglia, acredita-se que células gliais mesodérmicas invadam o sistema nervoso central durante a fase embrionária do desenvolvimento. Subsequentemente, no período após o nascimento, ocorre uma segunda migração de monócitos derivados da medula e, desta forma, ocorre a formação da micróglia (CHAN et al., 2007; ROCK et al., 2004). A micróglia é classificada em dois grupos celulares, de acordo com sua morfologia e seu estado de ativação, as quais são a micróglia em repouso, anteriormente denominada como micróglia quiescente e a micróglia ativada.

A micróglia quiescente é morfologicamente típica, ramificada, com corpo celular pequeno (5-10  $\mu\text{m}$ ) e núcleo que preenche quase completamente o soma (PERRY; GORDON, 1988). Numerosas ramificações, delgadas e longas, também conhecidas como processos microgliais, emergem a partir do soma. Uma característica marcante destas células é que elas se tornam rapidamente ativadas em resposta a um pequeno estímulo patológico no sistema nervoso central. Já a micróglia ativada, apresenta alterações morfológicas características e adquirem propriedades fagocíticas, atuando no reparo tecidual e na regeneração neural (KREUTZBERG, 1996), na defesa do parênquima neural contra doenças infecciosas, trauma, isquemia, tumores cerebrais e na neurodegeneração.

As alterações morfológicas incluem o aumento do corpo celular, o encurtamento e a hipertrofia das ramificações. As células podem adquirir formato esférico ou amebóide podendo apresentar ausência de ramificações (BRIERLEY; BROWN, 1982). A forma amebóide é evidente durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário e durante a plasticidade, enquanto que a quiescente é encontrada na vida adulta em condições fisiológicas.

A ativação microglial também é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas como o MHC (*major histocompatibility complex*), o receptor para o

complemento-3 (CR3), as integrinas  $\beta 2$  (CD11b e CD11c) e uma variedade de receptores para citocinas, quimiocinas e outras substâncias liberadas no sistema nervoso central. As alterações funcionais da micróglia ativada incluem a migração para áreas lesionadas, a fagocitose, a apresentação de antígenos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (WATKINS; MAYER, 2003). Além disso, a ativação microglial está envolvida com o sistema imune adaptativo, uma vez que estas células são componentes chave no recrutamento leucocitário (ALOISI, 2001). Outras funções importantes da micróglia incluem a indução do apoptose em subpopulações específicas de neurônios durante o desenvolvimento (MARÍN-TEVA et al., 2001), o controle da sinaptogênese (ROUMIER et al., 2004), a síntese de fatores neurotróficos e a regulação da transmissão sináptica (COULL et al., 2005) e da astrogliose (ALLIOT et al., 1991; STREIT et al., 1999). A ativação microglial aguda é geralmente benéfica pois atua de maneira protetora ao organismo. Porém, a ativação crônica leva a mudanças neuronais, além de contribuir para a destruição neuronal, que é observada em certas doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (KHOURY et al., 2007) e a doença de Parkinson (CARDONA et al., 2006).

Além disso, em modelos animais, a inibição da função glial pela administração de minociclina, uma enzima que inibe o metabolismo microglial, atenua a dor neuropática e a inflamatória (CHACUR et al., 2004; MILLIGAN et al., 2003).

## 2.7 ATIVAÇÃO GLIAL E A MODULAÇÃO DA DOR

Nas últimas décadas, diversos estudos têm voltado sua atenção às células gliais, principalmente astrócitos e micróglia, com o intuito de melhor esclarecer suas funções em modelos de dor experimental (MILLIGAN et al., 2002; SCHOLZ; WOOLF, 2007).

A importância das células da glia da medula espinal em processos nociceptivos foi primeiramente evidenciada por Garrison e colaboradores (1991), que mostraram o aumento da densidade destas células, mais especificamente de astrócitos na medula espinal, após a indução de ligaduras no nervo isquiático

(GARRISON et al., 1991). Ainda, a hiperalgesia térmica resultante da injeção *s.c.* de formalina e *i.p.* de endotoxina (WATKINS et al., 1999) é bloqueada pela injeção intratecal de inibidores gliais. Da mesma forma, a alodínia mecânica resultante da injeção periférica de zimosan, um polissacarídeo presente na superfície de fungos, como leveduras, utilizado para induzir inflamação experimental (SATO et al., 2003) é também bloqueada por inibidor metabólico das células da glia (MILLIGAN et al., 2000). Estudos realizados por Chacur e colaboradores (2007), mostraram que o inibidor do TNF $\alpha$  e a minociclina, foram capazes de diminuir a hiperalgesia induzida pela injeção de Adjuvante Completo de Freund (CFA) no músculo gastrocnêmio de ratos, sugerindo a participação de células gliais e citocinas neste fenômeno (CHACUR et al., 2007, 2009).

Alterações neuroimunes têm sido implicadas no desencadeamento da dor induzida por diversos tipos de lesão em tecidos periféricos (WATKINS et al., 2001). Na medula espinal, as células gliais são ativadas em resposta a uma ampla variedade de condições que produzem respostas de dor exagerada como inflamação crônica dos tecidos e lesão de nervos (WATKINS et al., 2001). Além disso, a glia também pode ser ativada por patógenos (vírus e bactérias), substâncias liberadas por fibras aferentes primárias que transmitem a informação dolorosa da periferia para a medula espinal e que possuem receptores nas células gliais (ATP, aminoácidos excitatórios, substância P e fractalcina) ou substâncias liberadas dos neurônios de segunda ordem da medula espinal que conduzem a informação dolorosa da medula espinal para o cérebro (prostaglandinas, óxido nítrico e fractalcina) (WATKINS et al., 2001; WATKINS; MAIER 2002).

No início da década de 90 foram publicados os primeiros trabalhos demonstrando que em modelos animais de dor neuropática, induzida por lesão em nervos periféricos, havia ativação de astrócitos no corno dorsal da medula espinal (GARRISON et al., 1991). Além disso, drogas que bloqueavam a dor neuropática, como o antagonista do receptor glutamatérgico NMDA, o MK801, inibiam a ativação astrocítica (GARRISON et al., 1991). Estes estudos demonstraram pela primeira vez uma possível relação entre a ativação glial e o desenvolvimento da dor neuropática. Em adição, estudos mais recentes utilizando modelos animais tem demonstrado que outros estímulos, como ligação de nervos periféricos (COYLE, 1998), injeção subcutânea de formalina (FU et al., 2000) ou adjuvante completo de Freund (CFA) (RAGHAVENDRA et al., 2004) e a lesão da medula espinal (NESIC et al., 2005;

POPOVICH et al., 1997; SROGA et al., 2003; ZAI; WRATHALL, 2001), também são capazes de induzir ativação das células gliais no sistema nervoso central, particularmente na medula espinal. O bloqueio da ativação das células gliais através da injeção intratecal do fluorocitrato, um inibidor metabólico glial, reduziu a dor gerada por estímulos que induzem tanto a inflamação do tecido subcutâneo (MELLER et al., 1994; WATKINS et al., 1997) quanto a inflamação de nervos periféricos (WATKINS; MAYER, 2000). A inibição da micróglia, com a minociclina, um inibidor seletivo do metabolismo microglial, também atenuou a hiperalgesia e a alodínia em modelo de dor neuropática (RAGHAVENDRA et al., 2003). Além disso, outros achados também demonstraram que a interrupção da ativação glial atenuou a tolerância produzida pela morfina, sugerindo que as substâncias liberadas pela glia atuam contrapondo-se aos efeitos do opióide administrado cronicamente (SONG; ZHAO, 2001). Diante destas evidências de que a ativação das células gliais contribui para a geração e manutenção da hipersensibilidade à dor, vários estudos têm sido realizados para investigar quais moléculas são capazes de induzir a ativação glial, bem como quais substâncias liberadas pela glia que podem alterar a atividade neuronal e, desta forma, contribuir tanto para a geração quanto para manutenção da dor.

Estudos prévios demonstraram que as células gliais expressaram receptores para muitas das substâncias liberadas pelos neurônios. Na medula espinal, por exemplo, os astrócitos e a micróglia expressam receptores para glutamato (BESONG et al., 2002), ATP (TSUDA et al., 2003), substância P (MARRIOT, 2004), CGRP (PRILLER et al., 1995; REDDINGTON et al., 1995) e citocinas pró-inflamatórias, como a fractalcina (ASENSIO; CAMPBELL, 1999; VERGE et al., 2004).

Outros receptores amplamente expressos nas células gliais são os receptores para canabinóides (CB<sub>2</sub>), principalmente na micróglia, regulando sua motilidade e produção imunomoduladora (ATWOOD; MACKIE, 2010; PERTWEE et al, 2010).

Neste cenário complexo, o sistema endocanabinóide pode representar um alvo interessante por modular a comunicação microglia-astrócitos-neurônio. De fato, os endocanabinóides são liberados “sob demanda” pelos neurônios, bem como por astrócitos e micróglia (WATTERS et al., 2002). É digno notar que as células microgliais produzem 20 vezes mais endocanabinóides em comparação com os neurônios e astrócitos (WATTERS et al., 2002).

Muitas moléculas liberadas no SNC têm sido cogitadas como capazes de ativar as células gliais, especialmente porque apresenta algumas características que a diferencia das demais substâncias liberadas pelos neurônios (MILLIGAN et al., 2004; SUN et al., 2007). A fractalcina é a única citocina expressa constitutivamente e liberada pelos neurônios no sistema nervoso central, enquanto que seu receptor (CX3CR1) é expresso exclusivamente na glia (ASENSIO; CAMPBELL, 1999; VERGE et al., 2004). Trata-se de uma citocinamiostática, único membro pertencente à classe CX3C, cuja estrutura é caracterizada por ter duas cisteínas separadas por três aminoácidos (ASENSIO; CAMPBELL, 1999). A fractalcina existe nas formas solúvel e ligada à membrana extracelular (BAZAN et al., 1997; PAN et al., 1997), é a única que se liga em apenas um tipo de receptor, denominado CX3CR1 (CX3C receptor-1), que lhe é exclusivo (JUNG et al., 2000). Para ativar o receptor CX3CR1, a forma solúvel é clivada da membrana neuronal pela catepsina S, uma protease expressa e liberada pela micróglia (CLARK et al., 2007).

Alguns dados sugerem que a micróglia é responsável pela a atividade neuronal (HANSSON, 2006; MCMAHON et al., 2005), que quando ativadas sob condições fisiopatológicas, liberam substâncias que modificam a sinalização entre os neurônios (FIELDS; STEVENS GRAHAM, 2002; MARCHAND et al., 2005). Estas substâncias incluem óxido nítrico, o ATP e citocinas pró-inflamatórias (MARCHAND et al., 2005). Estes mediadores derivados de células gliais contribuem para a sensibilização central (MA & ZHAO, 2002), resultando em alodínia e hiperalgesia (MILLIGAN et al., 2000; SWEITZER et al., 1999).

## 2.8 CB<sub>2</sub> E GLIA

Os receptores para canabinóides do tipo 2 são expressos em células da glia de humanos e ratos (ASHTON et al., 2006; NUNEZ et al., 2004) e sua expressão aumenta especialmente as células gliais durante a inflamação (RAMIREZ et al., 2005; SHENG et al., 2005). Usando uma incisão de pata ou um modelo de lesão de nervo periférico mostraram que ativação in vivo do CB<sub>2</sub> na medula reduz a reatividade glial, medida como uma redução na expressão de CR3/CD11b (marcador microglial) ou molécula de adaptador de ligação do cálcio ionizado 1 (Iba-

1) na micróglia (ROMERO-SANDOVAL; EISENACH, 2007; ROMERO-SANDOVAL et al., 2008). Iba1 é um marcador citosólico da micróglia que está associado com um fenótipo pró-inflamatório e está envolvido na migração da micróglia (OHSAWA et al., 2000; 2004). Por conseguinte, o CB<sub>2</sub> reduz a ativação *in vitro* do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF) e óxido nítrico (NO) em micróglia (EHRHART et al., 2005; RAMIREZ et al., 2005) e é protetor contra a neurotoxicidade da micróglia em humanos (KLEGERIS et al., 2003). No entanto, o mecanismo intracelular de ação específica pelo qual a ativação do CB<sub>2</sub> altera o fenótipo microglial não foi previamente relatado.

Estudos demonstram que agonistas do receptor canabinóide CB<sub>2</sub> produzem alívio da dor em uma variedade de modelos animais (RICHARDSON, 2000). Os endocanabinóides atuam sobre as células da glia e neurônios inibindo a liberação de moléculas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e NO (CABRAL et al., 2001; MOLINA HOLGADO et al., 1997; 2002; PUFFENBARGER et al., 2000; SHOHAMI et al., 1997) e aumentando a liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 (KLEIN et al., 2000).

Em particular, a ativação dos receptores CB<sub>2</sub> expressos na micróglia durante a neuroinflamação (ATWOOD; MACKIE, 2010; BENITO et al., 2008) reduziu a produção de NO e TNF- $\alpha$  na micróglia (EHRHART et al., 2005; MERIGHI et al., 2012.). Além disso, tal ativação microglial oferece proteção contra a neurotoxicidade através do aumento da produção de IL-10 (CORREIA et al., 2005; 2010; ELJASCHEWITSCH et al., 2006; KLEGERIS et al., 2003).

A ativação dos receptores CB<sub>2</sub> também reduziu a ativação glial, inibindo a liberação de fatores pró-inflamatórias pela micróglia, em modelos animais de hipóxia por isquemia peritoneal e doença de Huntington (BENITO et al., 2008).

Portanto, há algumas evidências de que o treinamento físico altera a atividade de astrócitos (BERNARDI et al., 2013) e micróglia (COBIANCHI et al., 2010), mas relação entre exercício e a ativação glial exige muito mais investigação.

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão descritos abaixo.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação de receptores canabinóides e o envolvimento da micróglia na dor muscular controlada pelo exercício físico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito do protocolo de treinamento físico sobre o controle da dor muscular;
- b) Investigar a participação a nível espinal de receptores CB<sub>2</sub> na dor muscular controlada pelo exercício físico;
- c) Investigar a participação da micróglia espinal na dor muscular controlada pelo exercício físico;
- d) Investigar o efeito do treinamento físico na temperatura muscular em modelo de dor muscular;
- e) Avaliar o efeito do treinamento físico na produção de citocinas inflamatórias em modelo de dor muscular.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizado neste estudo estão descritos a seguir.

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (figura 2), pesando entre 20 a 25g, provenientes do Biotério Central da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS). No período de realização dos experimentos, os animais foram mantidos em estantes ventiladas, sob controle de temperatura 23°C e com ciclo claro/escuro de 12 h controlado. Além disso, os animais tiveram livre acesso a ração e água. Esse projeto foi realizado de acordo com a comissão permanente local para experimentação ética com animais aprovado pela Autoridade de Proteção Animal da Universidade Federal de Alfenas-MG (UNIFAL), sob protocolo 628/2015, obedecendo às normas recomendadas pela IASP (ZIMMERMANN, 1983).

Figura 2- Camundongo da linhagem C57BL/6



Fonte: Da autora.

## 4.2 DROGAS

As seguintes drogas foram utilizadas no estudo: Carragenina (*Sigma-Aldrich*®), diluída em salina isotônica estéril (2%) e injetada no músculo gastrocnêmio direito em um volume de 50 µL; o AM630 (6-iodo-2-metil-1-[2-(morfolinil)etil]-1H-iodol-3-il(metoxifenil)metanona (TOCRIS®), antagonista para o receptor canabinóide CB<sub>2</sub>, diluída em salina isotônica estéril (2%) +DMSO (2%) +cremofor; o MAFP (ácido metil araquidonil fluorfosfano/(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-5, 8, 11, 14-eicosatetraenil-metil ester fosfofluorídrico) (TOCRIS®), inibidor da FAAH, diluído em etanol (3%); minociclina, inibidor seletivo da micróglia, diluída em tween 80, todas injetadas por via intratecal. Em alguns experimentos os animais receberam os veículos das drogas descritas acima, salina, salina+DMSO+cremofor, etanol e tween 80, injetados de acordo com seus respectivos volumes.

## 4.3 ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

A forma de administração das drogas serão des ritas a seguir.

### 4.3.1 Administração Intratecal

Para a realização das injeções intratecais, utilizamos o método proposto por Hylden e Wilcox (1980). Inicialmente, os animais foram sedados por inalação de isoflurano (2%) por meio de um sistema de vaporização calibrada. Após encontrar o osso ilíaco (espinhas ilíacas ventrais), uma agulha de número 29G (13 x 0,33) foi inserida diretamente no espaço subaracnóideo entre as vértebras lombares L5 e L6 do animal. Imediatamente após a inserção e, após a verificação do *flint* (retirada da cauda), foi inserida a agulha no espaço subaracnóideo da medula e realizada a injeção (figura 3).

Previamente a esse procedimento e com o objetivo de assegurar a administração correta das drogas, foi realizado um treinamento prévio para o aprimoramento dessa técnica com a injeção de 0,5  $\mu$ L de lidocaína (2%). Como resposta positiva da administração *i.t.*, observava-se a paralisia dos membros traseiros dos animais (RADHAKRISHNAN et al., 2003).

As drogas e seus veículos foram injetadas intratecalmente antes da última medida do limiar nociceptivo (início da quarta semana) do treinamento físico, para os animais exercitados e os animais sedentários.

Figura 3- Via de administração intratecal.



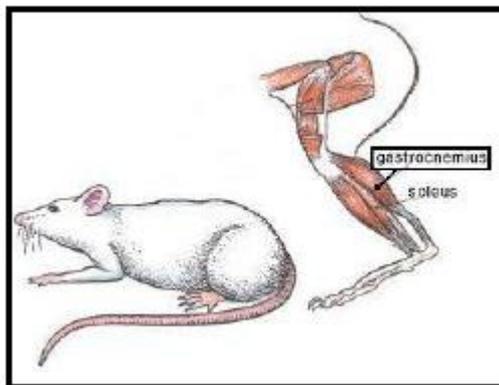
Fonte: Oliveira (2015)

#### 4.3.2. Injeção intramuscular

Os animais receberam 50 $\mu$ L de injeção intramuscular de carragenina (2%) diluída em salina estéril no músculo gastrocnêmio direito. Os animais controle receberam a mesma quantidade de salina (veículo) (figura 4).

Este procedimento foi utilizado para a realização do modelo de dor muscular.

Figura 4- Local de injeção da carregenina:  
músculo gastrocnêmio direito



Fonte: Bender (2012)

#### 4.4 EXERCÍCIO FÍSICO

Neste estudo, o protocolo de exercício físico utilizado foi o de natação, a qual foi realizada por 5 dias, durante três semanas, iniciada 24 horas após a indução da dor muscular pela injeção *i.m.* de carragenina. Para a realização do exercício, os animais foram colocados em uma caixa de vidro, com dimensões de 15x9 cm, com água aquecida a 37°C. Foi acrescentado 20% do volume de sabão líquido no total de água para reduzir a tensão superficial da água e evitar o comportamento de 'flutuar' dos animais. Após cada sessão de natação os animais foram cuidadosamente secos com toalhas de tecido (MAZZARDO-MARTINS *et al.*, 2010).

Na Tabela 1 está descrito o protocolo de treinamento físico no qual os animais foram submetidos ao longo de três semanas.

Tabela 1- Protocolo de exercício físico (natação).

Dias da semana	Tempo (min)/ 1ª semana	Tempo (min)/ 2ª semana	Tempo (min)/ 3ª semana
1	15	30	45
2	15	30	45
3	15	30	45
4	15	30	45
5	15	30	45

Nota: Na primeira semana, os animais realizaram uma adaptação, nadando por um período de 15 minutos por dia, durante 5 dias. Já na segunda semana, nadaram por um período de 30 minutos por dia, durante 5 dias na semana e na terceira semana, nadaram 45 minutos por dia, durante 5 dias. Ao final da primeira e segunda semana, em um intervalo de 2 dias, os animais não realizaram exercício.

Fonte: Da autora.

Inicialmente, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo o Sal+Ex (n=6), composto por animais que receberam injeção de salina e foram submetidos ao exercício; Cg+Ex (n=6), composto por animais que receberam injeção de carragenina e foram submetidos ao exercício; Sal+Sed (n=6), composto por animais que receberam injeção de salina e não realizaram exercício e Cg+Sed (n=6), formado por animais que receberam injeção de carragenina e não foram submetidos ao exercício. Já, para investigar a participação de receptores para canabinóides do tipo II, endocannabinóides e micróglia, os animais foram divididos em grupos experimentais, igualmente como os descritos acima, porém com a pré-injeção dessas drogas e seus respectivos veículos, por via intratecal, após a terceira semana do treinamento físico.

## 4.5 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO

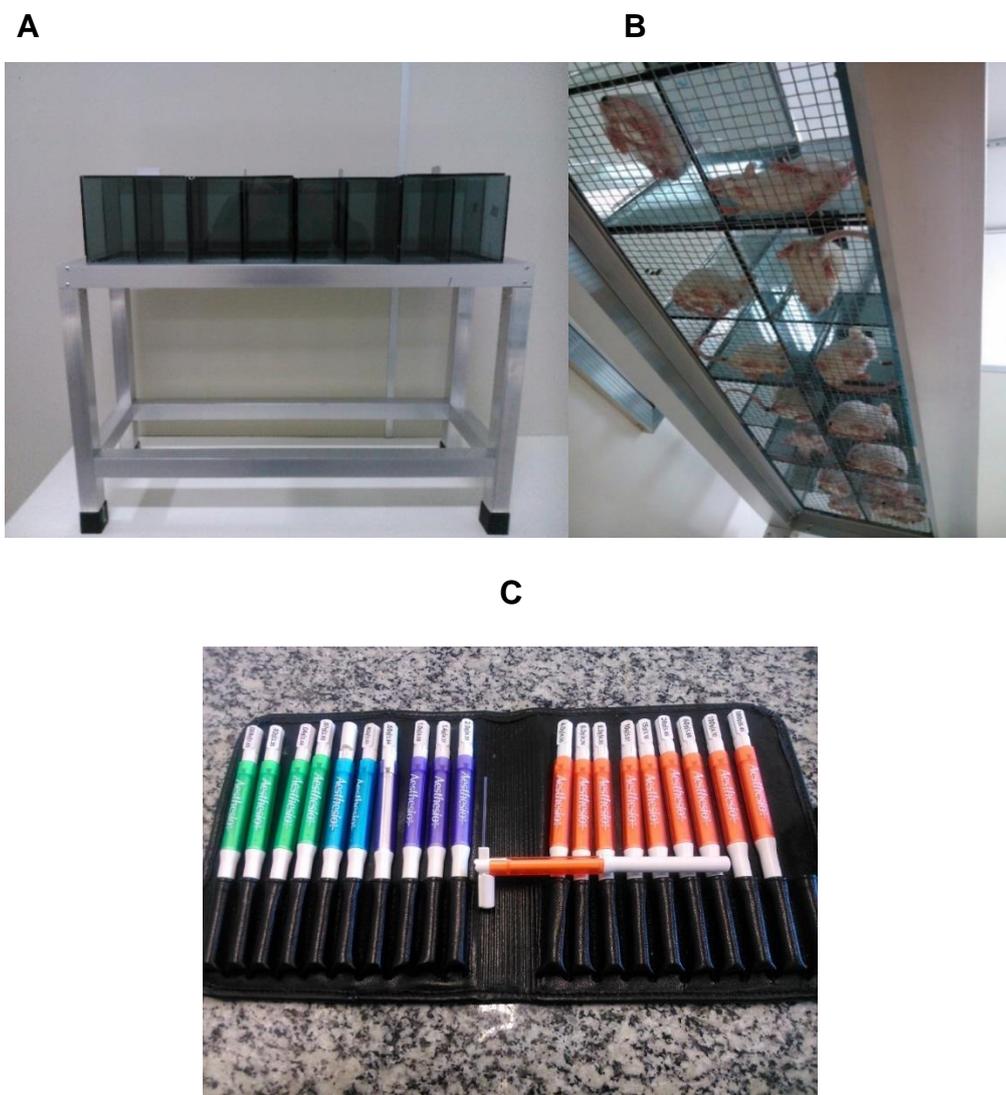
Em seguir, demonstramos os testes utilizados para avaliar os limiares nociceptivos.

### 4.5.1 Teste de alodínia mecânica: Von Frey filamentos

Inicialmente os animais permaneceram em suas caixas na sala de comportamento por 30 minutos para se habituarem. Logo em seguida, foram colocados em caixas individuais de vidro, (figura 5A) posicionadas sobre uma grade de metal, a qual permitiu a avaliação do limiar nociceptivo mecânico pela pata direita de cada animal (figura 5B). Os limiares de retirada da pata foram avaliados por meio do von Frey Filamentos, o qual realiza uma pressão mecânica, por meio de filamentos de diferentes espessuras (figura 5C), aplicado de forma perpendicular com força suficiente para curvá-los na superfície plantar da pata posterior direita de cada animal. Foram realizadas 3 medidas do limiar nociceptivo em cada animal, separadas por intervalos de 3 minutos e a média das 3 medidas foi descrita como o limiar mecânico de retirada de pata em gramas (g).

A medida basal (MB) do limiar nociceptivo mecânico foi realizada antes da injeção de carragenina. Medidas posteriores do limiar nociceptivo foram realizadas no final da segunda semana e final da terceira semana de treinamento físico.

Figura 5- Teste de Von Frey filamento.



Nota: A e B aparato utilizado para colocar os animais durante o experimento. A: visão completa das caixas dispostas sobre a mesa; B: visão inferior da grade de metal e posicionamento dos camundongos; C: os filamentos utilizados e em destaque uma amostra do posicionamento desse filamento durante a aplicação do estímulo.

Fonte: Oliveira (2015)

#### 4.5.2 Teste de hiperalgesia térmica: Placa quente

Além do teste descrito acima, realizamos outro teste que permite a avaliação da sensibilidade térmica nociceptiva dos animais: o teste da placa quente. Este teste mensura a latência (em segundos) da resposta do estímulo térmico aplicado na superfície plantar da pata dos animais. Para a realização de tal, cada camundongo foi colocado individualmente sobre a placa (figura 6) em uma sala de temperatura

controlada ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Os valores de latência de retirada da pata foram calculados a partir de uma média de 3 retiradas consecutivas da pata direita, medidas com um intervalo de 10 minutos. O tempo-limite imposto para evitar danos ao tecido foi de 30 segundos.

Figura 6- Aparato utilizado para o teste da hiperalgesia térmica: placa quente.



Fonte: Da autora.

#### 4.6 TERMOGRAFIA

A termografia é uma técnica não-invasiva, sem contato, que detecta a área de superfície aquecida com radiação IV (TURNER, 1991).

No presente estudo, os dados da termografia foram captados antes do início do tratamento (indução da dor muscular e treinamento físico) e logo após a última semana (terceira) do treinamento físico. As imagens foram captadas utilizando um Termovisor FLIR Série T420 (Flir System AB, Suécia) capaz de permitir análises precisas de temperaturas de superfície com variações entre  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $650^{\circ}\text{C}$  (Figura 7).

Para tal, os animais sedados por inalação de isoflurano (2%) foram colocados sobre a bancada e o termovisor foi posicionado a 30 cm da área avaliada e incidindo de modo perpendicular à mesma, considerando emissividade de 0,98 para estudo em roedores (TURNER, 1991) em uma sala com a temperatura controlada a 23°C por ar condicionado e com umidade relativa do ar em 55%. Antes do procedimento, esperou-se durante 15 minutos para adaptação as condições da sala.

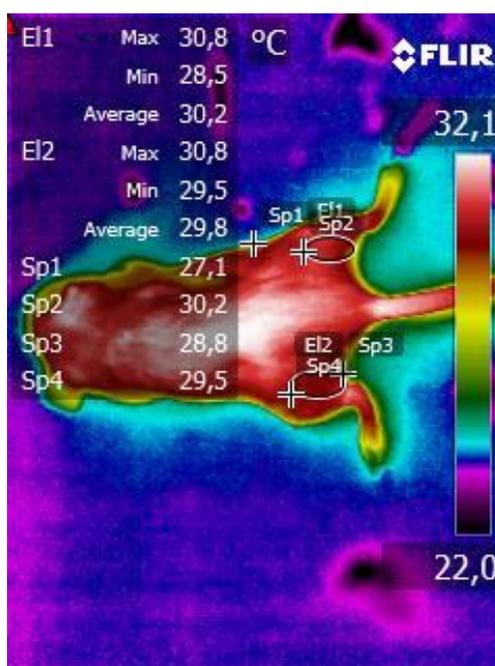
As imagens foram captadas e analisadas por *software* (FLIR Quick Report-Versão 1.2) (figura 8).

Figura 7- Termovisor FLIR Série T420 (Flir System AB, Suécia)



Fonte: Da autora.

Figura 8- Posicionamento do animal sobre a bancada para o registro das imagens termográficas dos membros inferiores.



Fonte: Da autora.

## 4.7 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS E DOSAGEM DE CITOCINAS PELO ENSAIO DE ELISA

Para a investigação do efeito do treinamento físico sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no modelo de dor muscular, foi realizado o ensaio de ELISA.

Imediatamente após último dia do protocolo de treinamento físico os músculos gastrocnêmios direitos de cada animal exercitado ou controle foram removidos e colocados em microtubos contendo uma solução com PBS 0,1 M (pH=7.4). Logo em seguida, os músculos foram homogeneizados e o homogenato foi centrifugado a 3,000 x g por 10 minutos em uma temperatura de 4 °C e cada sobrenadante foi adicionado em criotubos, os quais foram armazenados em um biofreezer em temperatura a -80 °C até o momento da análise.

### 4.7.1. ELISA- *Enzyme linked immuno sorbent assay*

ELISA é um imunoenensaio que utiliza um ou mais anticorpos específicos para um determinado antígeno para a quantificação da molécula de interesse.

Para a análise dos níveis de interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) e do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no músculo gastrocnêmio direito, foi utilizado kits de ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) específicos para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  de camundongo (PeproTech®). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Logo em seguida, microplacas com 96 orifícios foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura e posteriormente tiveram os sítios inespecíficos bloqueados com solução de albumina bovina. Após lavagem, as amostras ou padrões foram incubados para possibilitar a quantificação. Seguiu-se a adição de anticorpo de detecção, incubação com solução de avidina-peroxidase e posterior adicionamento da solução cromogênica para leituras das reações colorimétricas que foram realizadas a 405nm em leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek). Cálculos

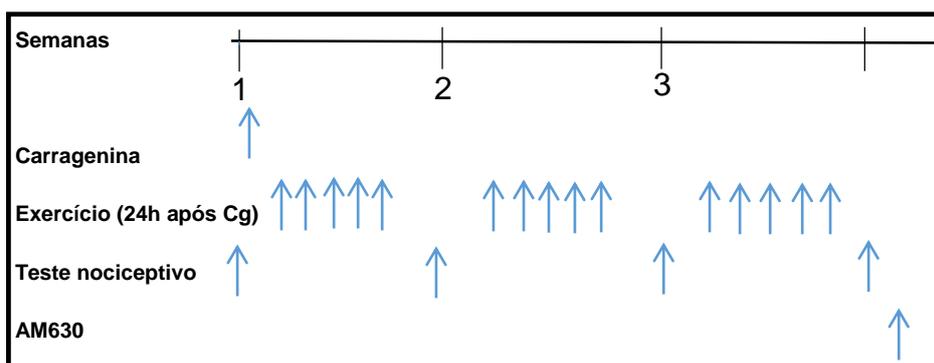
foram realizados a partir da curva padrão para determinação das concentrações das amostras.

#### 4.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na fase inicial, utilizou-se quatro grupos (Sal+Ex, Cg+Ex, Sal+Sed, Cg+Sed). Antes da injeção intramuscular (*i.m.*) de carragenina, os animais foram submetidos a uma medida basal do limiar nociceptivo de retirada da pata, através do filamento de Von Frey e da placa quente. Na continuidade desse experimento, o limiar nociceptivo de retirada da pata foi mensurado do final da primeira, da segunda e da terceira semana de treinamento físico, conforme demonstrado na figura 8.

Para investigar a participação do receptor para canabinóides (CB<sub>2</sub>) no controle da dor muscular, o AM630, antagonista do receptor CB<sub>2</sub>, foi injetado *i.t.* antes da última medida do limiar nociceptivo (figura 9).

Figura 9: Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico. Os animais receberam carragenina ou veículo antes do início do protocolo de treinamento físico e AM630 ou veículo após o

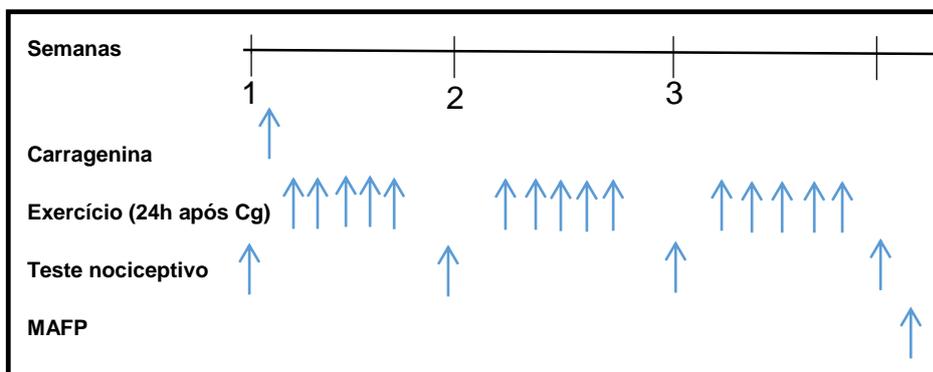


Nota: Cg: carragenina.

Fonte: Da autora.

Para averiguar a participação dos endocanabinóides no controle da dor muscular, O MAFP, inibidor da FAAH, enzima responsável pela degradação da anandamida, foi pré-administrado *i.t.* antes da última medida do limiar nociceptivo, ou seja, depois da terceira semana de treinamento físico (figura 10).

Figura 10- Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico. Os animais receberam carragenina ou veículo antes do início do protocolo de treinamento físico e MAFP ou veículo após o treinamento.

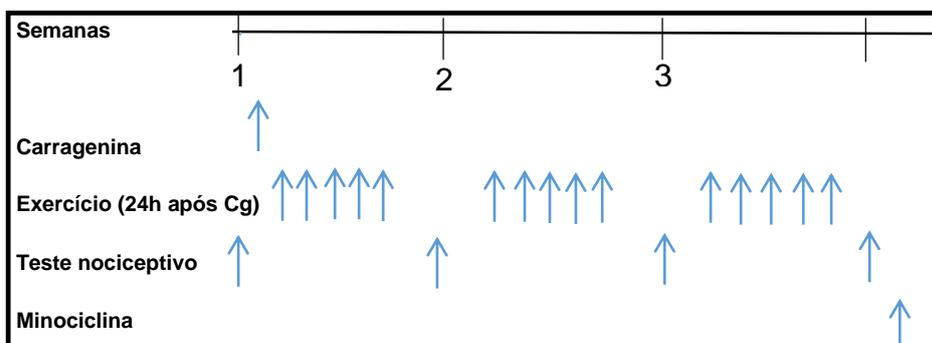


Nota: Cg: carragenina.

Fonte: Da autora.

Já, para demonstrar a participação das células da glia, a nível espinal, principalmente a micróglia, administramos a minociclina, uma droga inibidora seletiva da micróglia, no final da terceira semana de exercício (figura 11).

Figura 11- Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico. Os animais receberam carragenina ou veículo antes do início do protocolo de treinamento físico e minociclina ou veículo após o treinamento.

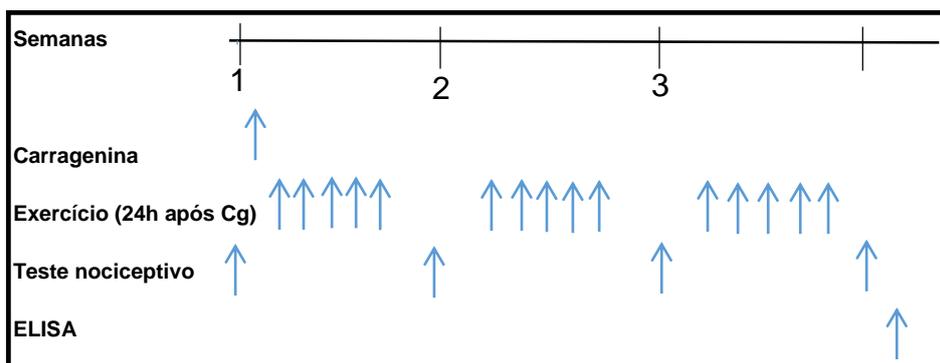


Nota: Cg: carragenina.

Fonte: Da autora.

Para determinar os níveis de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e sua participação no modelo de dor muscular, foi realizado o ensaio de ELISA, logo após a última semana de exercício físico (figura 12).

Figura 12- Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico e efeito das citocinas sobre a dor muscular.

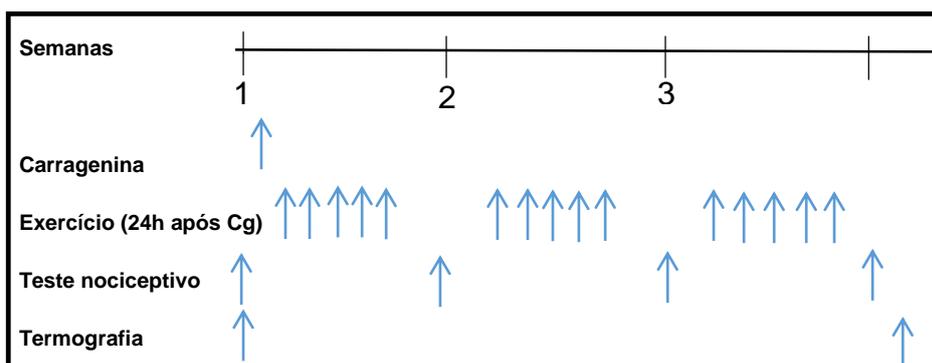


Nota: Os animais receberam carragenina ou veículo antes do início do protocolo de treinamento físico. O ensaio de ELISA foi feito logo após a última semana de exercício. Cg: carragenina.

Fonte: Da autora.

Entretanto, sabe-se que a dor muscular gera inflamação e levando em conta que a isso leva ao aumento da temperatura local, investigamos o efeito do exercício na influência desse controle de temperatura. Sendo assim, utilizamos a técnica da termografia. As imagens foram captadas antes do início do treinamento e logo após a última semana de treinamento (figura 13).

Figura 13- Mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata após exercício físico e efeito do exercício sobre o controle da temperatura no modelo de dor muscular.



Nota: Os animais receberam carragenina ou veículo antes do início do protocolo de treinamento físico. A termografia foi realizada antes do início do treinamento e logo após a última semana de exercício. Cg: carragenina.

Fonte: Da autora.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média + EPM. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais, foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA). Já, o tratamento estatístico dos dados obtidos pelo ensaio de ELISA e a termografia foram analisados análise de variância de uma via (ANOVA). Ambas as análises foram seguidas pelo pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram consideradas estatisticamente significativas os valores de  $P < 0,05$ . As análises estatísticas e elaboração de figuras serão realizadas utilizando um *software* específico.

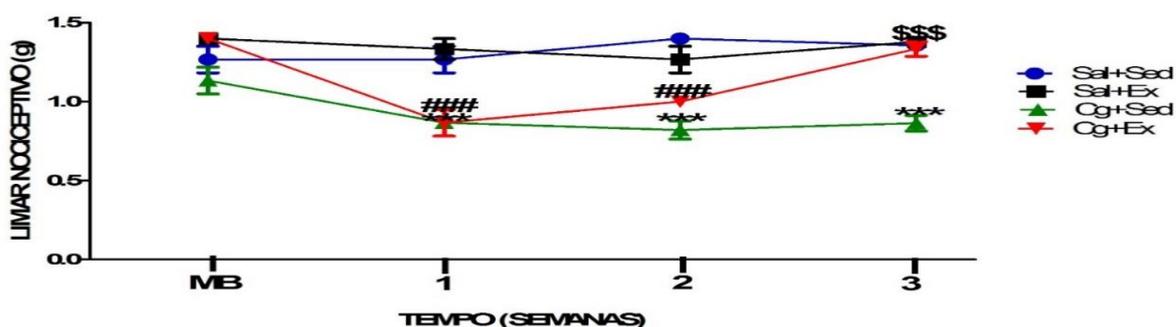
## 5 RESULTADOS

Em seguir, serão apresentados os resultados.

### 5.1 EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A DOR MUSCULAR INDUZIDA PELA CARRAGENINA.

No gráfico 1, observa-se que ao final da primeira semana após a injeção i.m. de carragenina, houve uma redução significativa do limiar nociceptivo ( $p < 0,001$ ), tanto nos animais sedentários quanto nos animais exercitados, comparados com os animais que receberam salina e não foram treinados. Essa redução perdurou por três semanas nos animais sedentários. Já no final da terceira semana, houve um aumento no limiar de retirada da pata ( $p < 0,001$ ) nos animais que foram submetidos ao exercício e que receberam carragenina, caracterizando um efeito antinociceptivo, em comparação aos animais não exercitados que também receberam carragenina.

Gráfico 1–Efeito do exercício físico na dor muscular. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



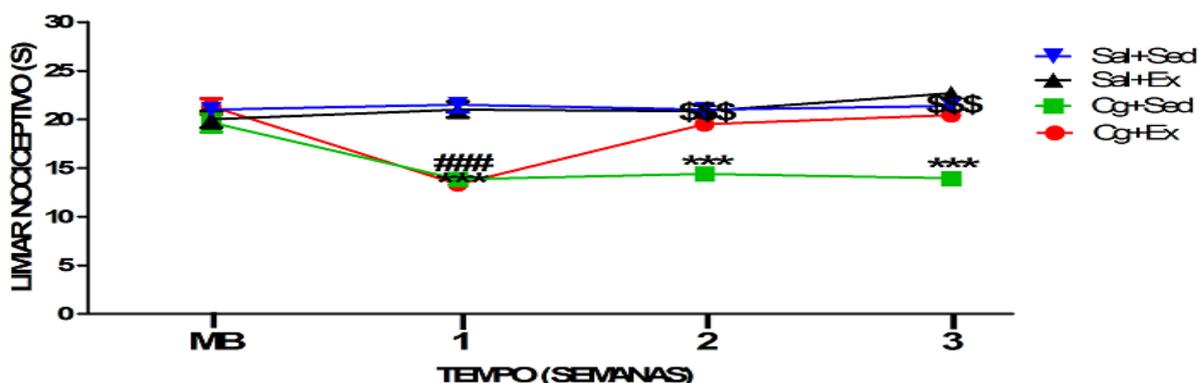
Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e não foram exercitados) x Sal+Sed (animais que receberam salina e não foram submetidos ao exercício físico), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam injeção de carragenina e foram exercitados) x Sal+Sed e \$\$\$ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex x Cg+Sed, n=6 por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Ex (animais que receberam salina e foram submetidos ao exercício).

Fonte: Da autora.

Já o gráfico 2 também demonstra que no final da primeira semana após a injeção i.m. de carragenina, houve uma redução significativa do limiar nociceptivo térmico ( $p < 0,001$ ) tanto nos animais sedentários quanto nos animais exercitados comparados com os animais que receberam salina. Além disso, essa redução também durou três semanas. Entretanto, no teste da placa quente, o efeito antinociceptivo induzido pelo nado nos animais com dor muscular foi verificado ( $p < 0,001$ ) já no final da segunda semana, permanecendo até o final da terceira semana, quando comparado aos animais não exercitados com dor muscular.

Os animais exercitados e sedentários que receberam salina não apresentaram alterações no limiar nociceptivo em ambos os testes.

Gráfico 2– Efeito do exercício físico na dor muscular. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (s), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e não foram exercitados) x Sal+Sed (animais que receberam salina e não foram submetidos ao exercício físico), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam injeção de carragenina e foram exercitados) x Sal+Sed e \$\$\$ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex x Cg+Sed, n=6 por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Ex (animais que receberam salina e foram submetidos ao exercício).

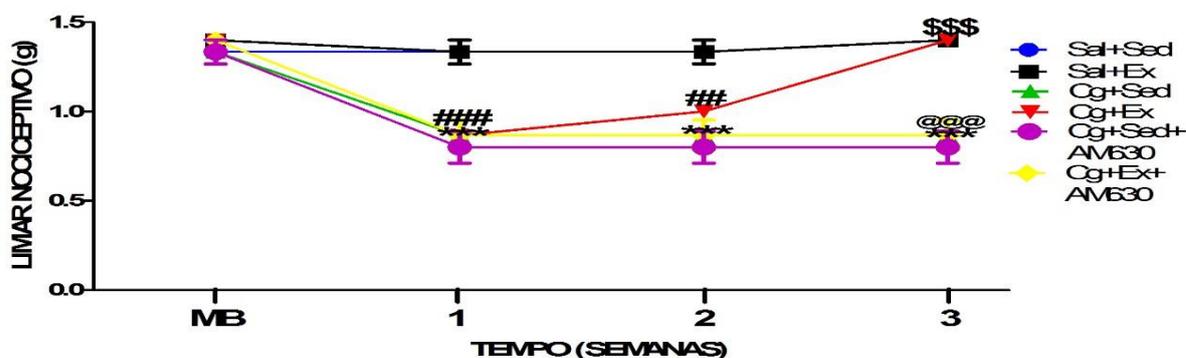
Fonte: Da autora.

## 5.2 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PARA CANNABINÓIDE DO TIPO 2 (CB<sub>2</sub>) NO CONTROLE DA DOR MUSCULAR PELO EXERCÍCIO FÍSICO

Uma vez demonstrado que o modelo de treinamento físico proposto pelo estudo promoveu antinociceção, o próximo passo do estudo foi investigar o envolvimento nesse efeito de receptores para canabinóides CB<sub>2</sub>, a nível espinal. Assim, verifica-se que o efeito antinociceptivo encontrado após a terceira semana de treinamento físico foi revertido significativamente ( $p < 0,001$ ) pelo antagonista para o receptor para canabinóide CB<sub>2</sub>, o AM630 (4 $\mu$ g, *i.t.*), em ambos testes, o Von Frey filamentos e a placa quente (Gráficos 3 e 4).

Contudo, tanto os animais que receberam salina e foram exercitados quanto os animais sedentários, não tiveram alterações no limiar de retirada da pata em ambos os testes.

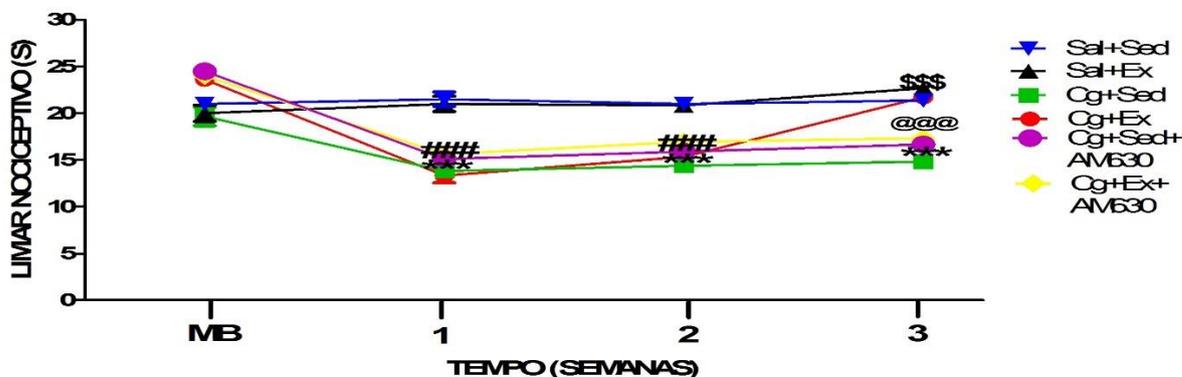
Gráfico 3—Participação do receptor para canabinóide (CB<sub>2</sub>) sobre o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício físico no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo Von frey filamentos antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, *i.m.* e não foram exercitados) x Sal+Sed (animais que receberam salina e que não foram submetidos ao exercício físico), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam injeção de carragenina e que foram submetidos ao exercício físico) x Sal+Sed, ## indica significância estatística ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos Cg+Ex x Sal+Sed, \$\$\$ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex x Cg+Sed e @@@ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex+AM630 (animais que receberam injeção de carragenina que foram submetidos ao exercício físico e receberam AM630, 4 $\mu$ g, *i.t.*) x Cg+Ex,  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Ex (animais que receberam salina e foram submetidos ao exercício) e Cg+Sed+AM630 (animais que receberam injeção de carragenina, que não foram exercitados e receberam AM630).

Fonte: Da autora.

Gráfico 4—Participação do receptor para canabinóide (CB<sub>2</sub>) sobre o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício físico no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (s), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e não foram exercitados) x Sal+Sed (animais que receberam salina e que não foram submetidos ao exercício físico), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam injeção de carragenina e que foram exercitados) x Sal+Sed, \$\$\$ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex x Cg+Sed e @@@ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos x Cg+Ex+AM630 (animais que receberam injeção de carragenina, que foram submetidos ao exercício físico e receberam AM630, 4 $\mu$ g, i.t.) x Cg+Ex, n=6 por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Ex (animais que receberam salina e foram submetidos ao exercício), Cg+Sed+AM630 (animais que receberam injeção de carragenina, que não foram exercitados e receberam AM630).

Fonte: Da autora.

### 5.3 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE ENDOCANABINÓIDES NO CONTROLE DA DOR MUSCULAR PELO EXERCÍCIO FÍSICO.

Com o intuito de investigar a participação de endocanabinóides no efeito antinociceptivo encontrado pelo nado, foi utilizado como ferramenta farmacológica, o MAFP (2 $\mu$ g, *i.t.*), um inibidor da enzima FAAH, a qual é responsável pela degradação da anandamida.

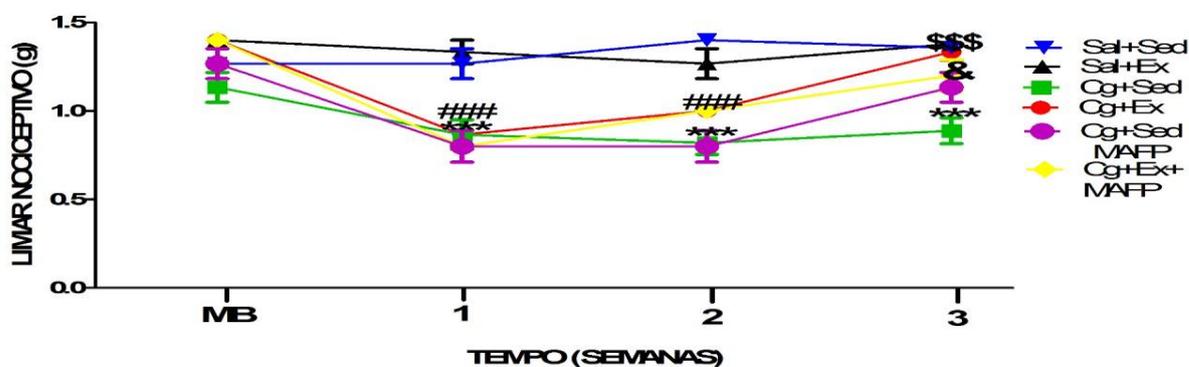
Desse modo, o MAFP não apresentou nenhum efeito significativo sobre o efeito antinociceptivo encontrado nos animais com dor muscular submetidos ao exercício, encontrado no teste Von Frey filamentos (Gráfico 5). Já no teste da placa quente (Gráfico 6), o efeito antinociceptivo encontrado ao final do treinamento nos

animais com dor muscular foi potencializado ( $p < 0,001$ ) em um grupo similar que recebeu MAFP.

Entretanto, os animais não treinados com dor muscular que receberam administração i.t. de MAFP tiveram a nocicepção inibida significativamente ( $p < 0,05$ ) no teste do Von frey filamentos e ( $p < 0,001$ ) no teste da placa quente, quando comparados aos animais não treinados com dor muscular.

Além do mais, os grupos controle não tiveram alterações no limiar de retirada da pata em ambos os testes.

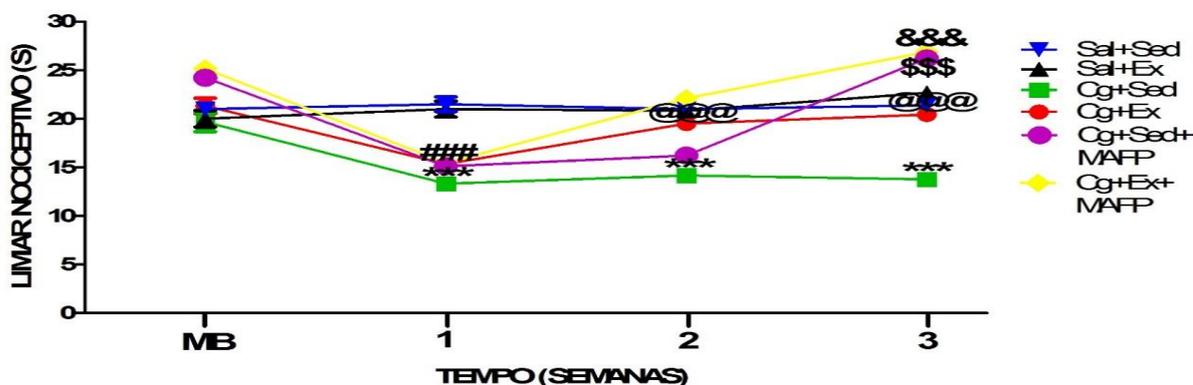
Gráfico 5– Participação dos endocanabinóides no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo Von Frey filamentos antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e não foram exercitados) x Sal+Sed (animais que receberam salina e não foram exercitados), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam injeção de carragenina e que foram submetidos ao exercício físico) x Sal+Sed, \$\$\$ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex x Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina e não foram exercitados) e & indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos Cg+Sed x Cg+Sed+MAFP (animais que receberam injeção de carragenina, não foram exercitados e receberam MAFP, 2 $\mu$ g, i.t.), n=6 por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Ex (animais que receberam salina e foram submetidos ao exercício) e Cg+Ex+MAFP (animais que receberam injeção de carragenina, que foram exercitados e receberam MAFP).

Fonte: Da autora.

Gráfico 6–Participação de endocanabinóides no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e não foram exercitados) x Sal+Sed (animais que receberam salina e não foram exercitados), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam injeção de carragenina e que foram submetidos ao exercício físico) x Sal+Sed, @@@ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que recebem injeção de carragenina e que foram submetidos ao exercício físico) x Cg+Sed, \$\$\$ indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Cg+Sed x Cg+Sed+MAFP (animais que receberam injeção de carragenina, não foram exercitados e receberam MAFP, 2 $\mu$ g, i.t.) e &&& indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Cg+Ex+MAFP (animais que receberam injeção de carragenina e foram exercitados e recebem MAFP) x Cg+Ex, n=6 por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Ex (animais que receberam salina e foram submetidos ao exercício).

Fonte: Da autora.

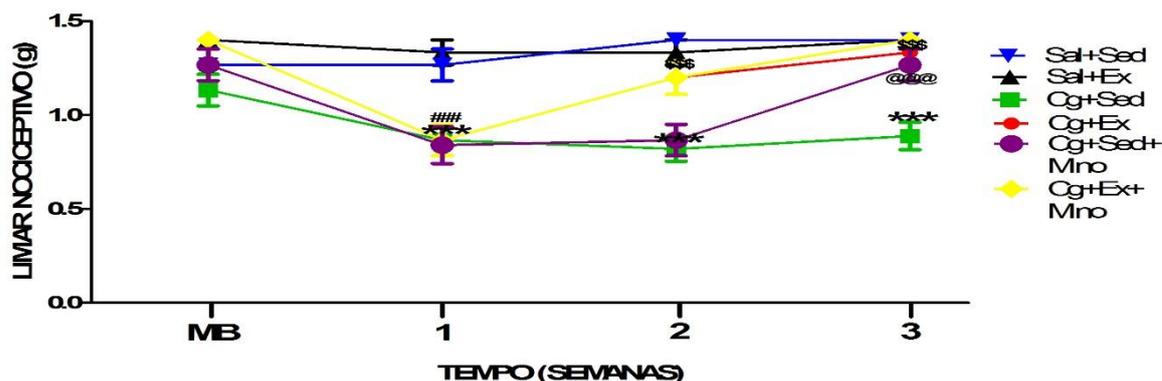
#### 5.4 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA MICROGLIA NO CONTROLE DA DOR MUSCULAR PELO EXERCÍCIO FÍSICO.

Para demonstrar a participação das células da glia, a nível espinal, na gênese da dor muscular de animais treinados e não treinados, foi pré-administrada a minociclina (30 ng, *i.t.*), uma droga inibidora seletiva da micróglia.

Sendo assim, a minociclina não apresentou nenhum efeito significativo sobre a redução da nocicepção encontrada nos animais exercitados que apresentavam dor muscular, nem no teste Von Frey filamentos e nem no teste da placa quente (Gráficos 7 e 8). Entretanto, a pré-administração de minociclina promoveu uma redução da alodínia mecânica e da hiperalgesia térmica nos animais não treinados com dor muscular ( $p < 0,001$ ).

Já, tanto os animais exercitados que receberam salina quanto os animais sedentários, não tiveram alterações nos limiares de retirada da pata em ambos os testes.

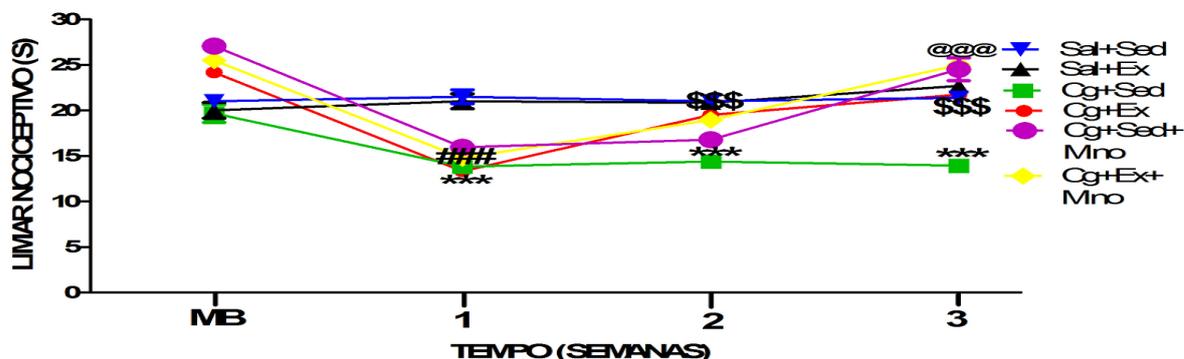
Gráfico 7–Participação da micróglia no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo Von Frey filamentos antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e não foram exercitados) x Sal+Sed (animais que receberam salina e não foram exercitados), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam injeção de carragenina e que foram submetidos ao exercício físico) x Sal+Sed, \$\$\$ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex x Cg+Sed e @@@ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Sed+Mino (animais que receberam injeção de carragenina, não foram exercitados e receberam minociclina, 30 ng, i.t.) x Cg+Sed, n=6 por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Ex (animais que receberam salina e foram submetidos ao exercício) e Cg+Ex+Mino (animais que receberam injeção de carragenina, que foram exercitados e receberam minociclina).

Fonte: Da autora

Gráfico 8– Participação da micróglia no controle da dor muscular. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e não foram exercitados) x Sal+Sed (animais que receberam salina e não foram exercitados), ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam injeção de carragenina e que foram submetidos ao exercício físico) x Sal+Sed, \$\$\$ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Ex x Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina e não foram exercitados) e @@@ indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Cg+Sed+Mino (animais que receberam injeção de carragenina, não foram exercitados e receberam minociclina, 30 ng, i.t.) x Cg+Sed, n=6 por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Ex (animais que receberam salina e foram submetidos ao exercício) e Cg+Ex+Mino (animais que receberam injeção de carragenina, que foram exercitados e receberam minociclina).

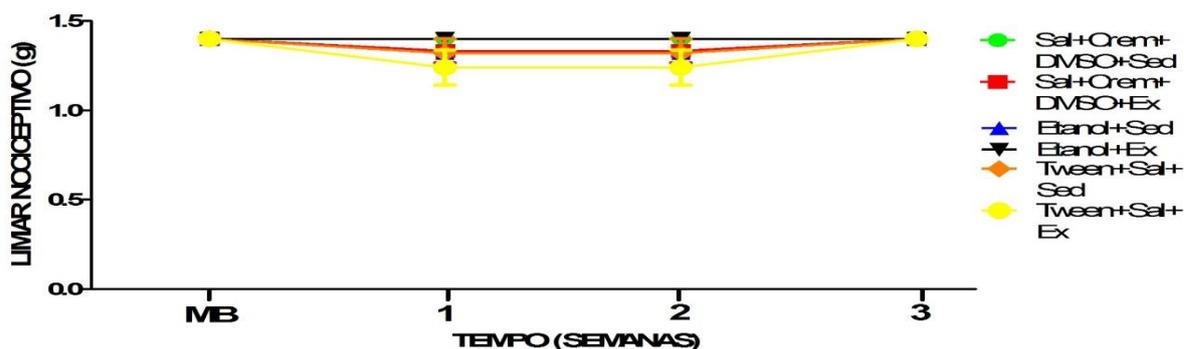
Fonte: da autora.

## 5.5 EFEITO DOS VEÍCULOS SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO DE RETIRADA DA PATA

Foi também investigado se algum dos veículos para as drogas utilizadas neste estudo poderia interferir no limiar nociceptivo dos animais.

Como podemos verificar nos gráficos 9 e 10, nenhum dos veículos, salina+cremofor+DMSO, etanol, tween 80, promoveu nenhuma alteração significativa no limiar nociceptivo no teste Von frey filamentos e nem no teste da placa quente, respectivamente.

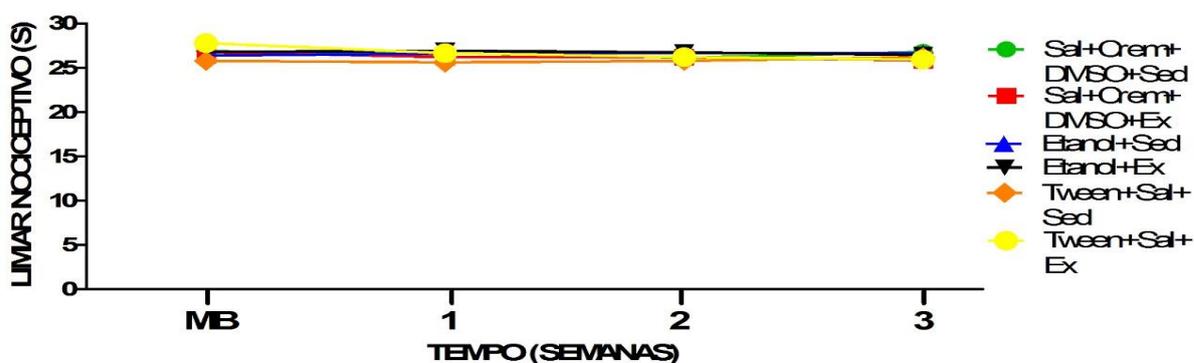
Gráfico 9– Efeito dos veículos sobre o teste do Von Frey filamentos. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste do Von Frey filamentos antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g), n=5 por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Crem+DMSO+Sed (animais que receberam 90% salina, 5% de cremofor, 5% de DMSO, i.t. e não foram submetidos ao exercício) e Sal+Crem+DMSO+Ex (animais que receberam 90% salina, 5% de cremofor, 5% de DMSO, i.t. e foram submetidos ao exercício), Etanol+Sed (animais que receberam etanol, 3%, i.t. e não foram exercitados), Etanol+Ex (animais que receberam etanol e foram exercitados), Tween+Sal+Sed (animais que receberam Tween 80, salina e não foram exercitados) e Tween+Sal+Ex (animais que receberam Tween 80, salina e foram exercitados).

Fonte: Da autora.

Gráfico 10– Efeito dos veículos sobre o teste da placa quente. O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste da placa quente antes do treinamento, no final da primeira, no final da segunda e no final da terceira semana.



Nota: Os dados representam a média + E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (s), n=5 por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. MB: medida basal do limiar nociceptivo, Sal+Crem+DMSO+Sed (animais que receberam 90% salina, 5% de cremofor, 5% de DMSO, i.t. e não foram submetidos ao exercício) e Sal+Crem+DMSO+Ex (animais que receberam 90% salina, 5% de cremofor, 5% de DMSO, i.t. e foram submetidos ao exercício), Etanol+Sed (animais que receberam etanol, 3%, i.t. e não foram exercitados), Etanol+Ex (animais que receberam etanol e foram exercitados), Tween+Sal+Sed (animais que receberam Tween 80, salina e não foram exercitados) e Tween+Sal+Ex (animais que receberam Tween 80, salina e foram exercitados).

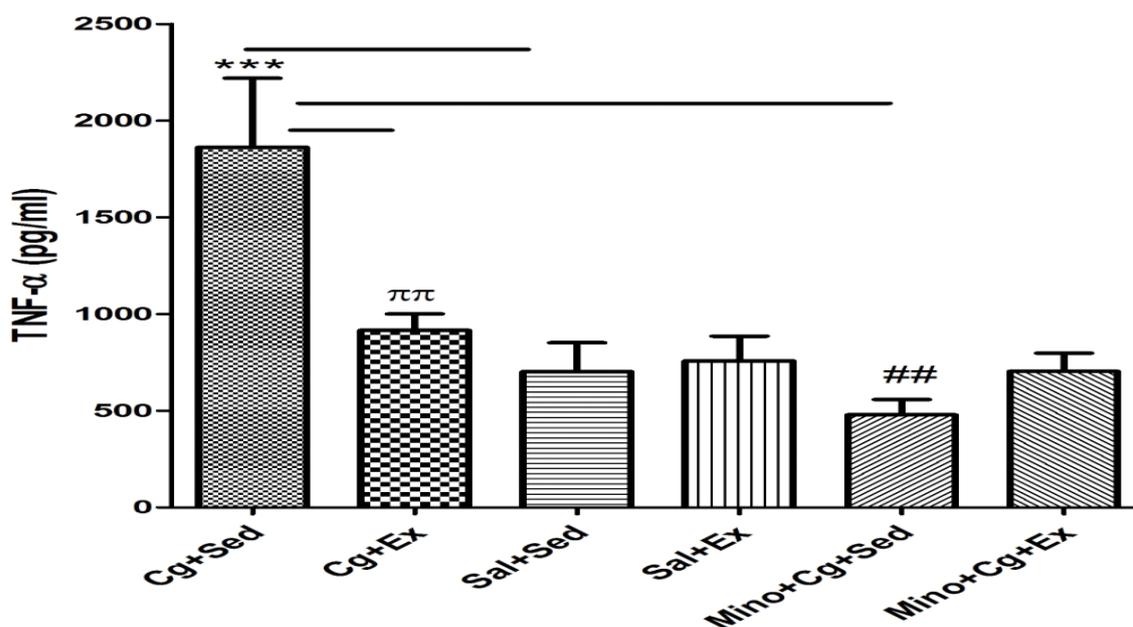
Fonte: Da autora.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO POR ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado para investigar a participação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , no modelo de dor muscular e também para avaliar o efeito do protocolo de treinamento físico nos níveis dessas citocinas.

Nesse contexto, o gráfico 11 demonstra que os níveis de TNF- $\alpha$  nos animais com dor muscular não treinados ficaram aumentados ( $p < 0,001$ ) quando comparados com os animais que receberam salina e não foram treinados. Já nos grupos de animais exercitados com dor muscular, esses níveis foram reduzidos significativamente ( $p < 0,01$ ), quando comparados com os animais com dor muscular não-exercitados. Podemos também observar o envolvimento da microglia na liberação do TNF- $\alpha$ , pois quando esta foi inibida pela minociclina, os níveis dessa citocina foram reduzidos ( $p < 0,01$ ) nos animais que não foram treinados que apresentavam dor muscular comparado aos animais que não foram treinados e que apresentavam dor muscular.

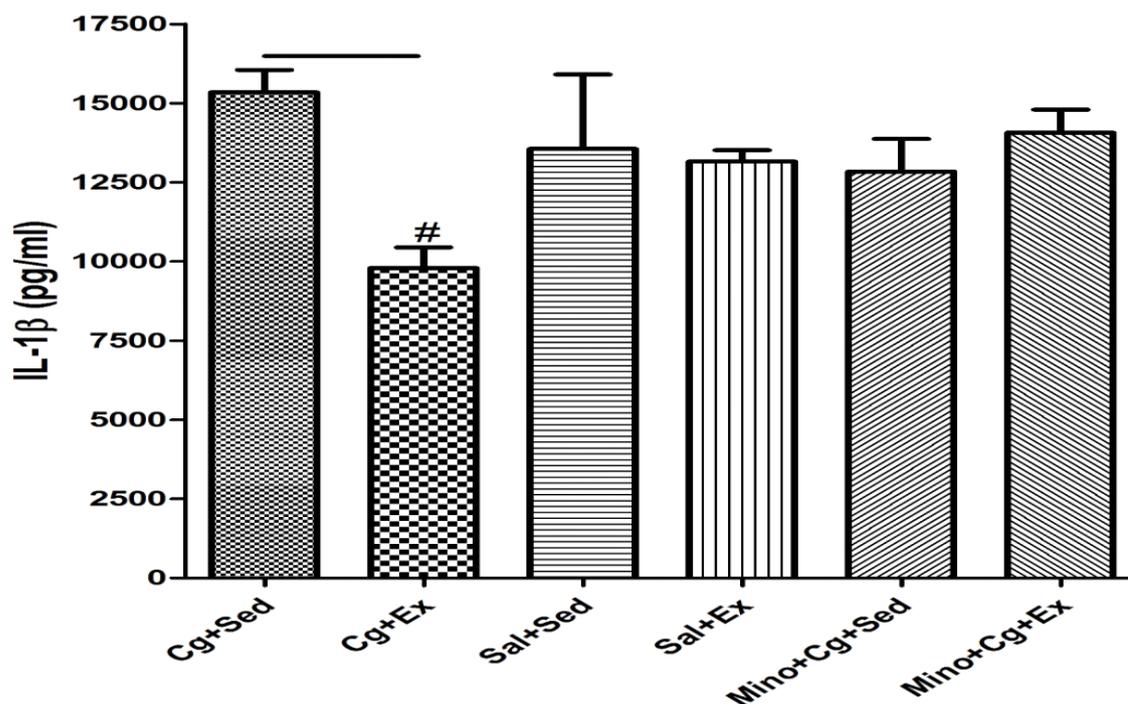
Além disso, podemos verificar que a injeção de salina *i.m.* não alterou os níveis de TNF- $\alpha$  nos animais treinados e não treinados.

Gráfico 11- Efeito do treinamento físico sobre os níveis musculares de TNF- $\alpha$ .

Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. dos níveis de TNF- $\alpha$  (pg/mL) realizados após a última semana de exercício físico. \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos Sal+Sed (animais que receberam salina e não foram submetidos ao exercício) x Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e não foram submetidos ao exercício), πππ indica significância estatística ( $p < 0,005$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam injeção de carragenina e que foram submetidos ao exercício físico) x Cg+Sed e ## indica significância estatística ( $p < 0,005$ ) em relação aos grupos Cg+Sed x Mino+Cg+Sed (animais que receberam minociclina, 30 ng, i.t., injeção de carragenina e não foram exercitados),  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Mino+Cg+Ex (animais que receberam minociclina, injeção de carragenina e foram exercitados).

Fonte: Da autora.

O gráfico 12 demonstra que os níveis de IL-1 $\beta$  não foram alterados em nenhum dos grupos experimentais, com exceção ao grupo composto por animais com dor muscular submetidos ao treinamento, onde os níveis foram encontrados significativamente ( $p < 0,05$ ) reduzidos.

Gráfico 12- Efeito do treinamento físico sobre os níveis musculares de IL-1 $\beta$ .

Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. dos níveis de IL-1 $\beta$  (pg/mL) realizados após a última semana de exercício físico. # indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos Cg+Ex (animais que receberam carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e foram submetidos ao exercício) x Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina e não foram submetidos ao exercício),  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Sal+Sed (animais que receberam salina e foram exercitados), Sal+Ex (animais que receberam salina e não foram exercitados), Mino+Cg+Sed (animais que receberam minociclina, 30ng, i.t., injeção de carragenina e não foram exercitados), Mino+Cg+Ex (animais que receberam minociclina, injeção de carragenina e foram exercitados).

Fonte: Da autora.

## 5.7 EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA TEMPERATURA CORPORAL APÓS DOR MUSCULAR

Estando a dor muscular relacionada com processo inflamatório, e, admitindo que a inflamação gera calor, supõe-se que o nível inflamatório pode ser avaliado através da medida da temperatura local e de acordo com os resultados previamente demonstrados, que o treinamento físico possa influenciar nesse processo. Assim, para investigar essa hipótese, utilizamos a termografia, uma técnica não-invasiva que mede a quantidade de radiação infravermelha emitida pelos corpos e fornece o valor da temperatura superficial dos mesmos.

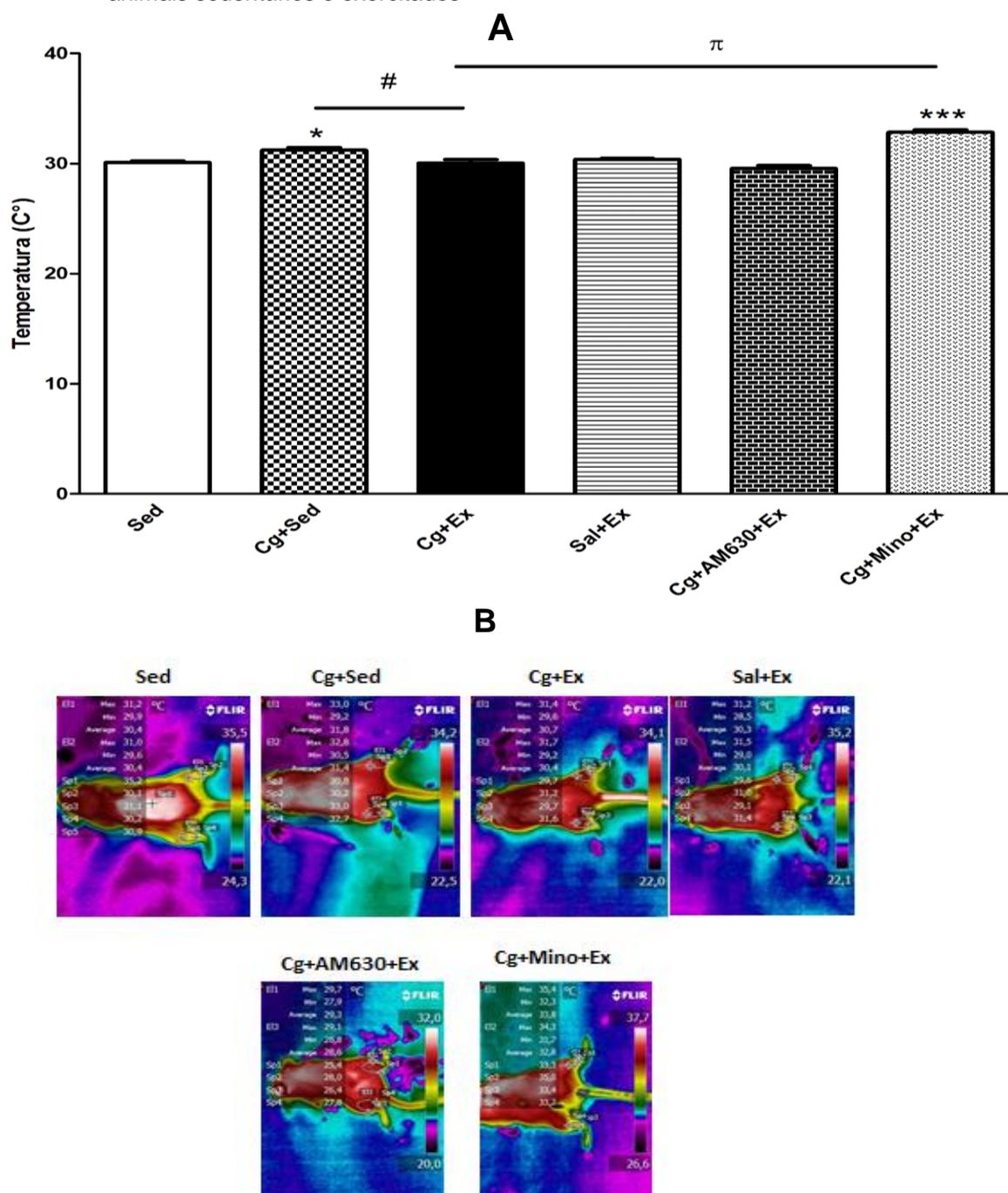
No gráfico 13, observamos por meio da termografia, que a injeção intramuscular de carragenina provocou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ), da temperatura corporal local (músculo gastrocnêmio direito) nos animais com dor muscular não exercitados quando comparados com os animais que receberam salina, avaliado ao final da terceira semana de treinamento físico. Contudo, os animais com dor muscular que foram submetidos ao treinamento físico tiveram uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) dessa temperatura.

Além disso, podemos observar que micróglia pode ser envolvida na termorregulação local dos animais com dor muscular exercitados, pois quando a micróglia foi bloqueada, a temperatura corporal nestes animais foi aumentada significativamente ( $p < 0,001$ ), comparada aos animais com dor muscular que não foram treinados.

Já, os receptores para canabinóides  $CB_2$  parecem não estar envolvidos com a redução da temperatura local encontrada no grupo exercitado com dor muscular, pois esta não foi alterada pelo antagonista para os receptores  $CB_2$ , o AM630.

Além disso, verifica-se que a administração de salina não alterou a temperatura local tanto nos animais exercitados que receberam salina quanto nos animais sedentários.

Gráfico 13- A- Efeito do treinamento físico sobre a temperatura corporal após dor muscular. B- Imagens representativas da temperatura local no músculo gastrocnêmio direito em animais sedentários e exercitados



Nota: Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da temperatura corporal (°C) realizados após a última semana de exercício físico. \* indica significância estatística ( $p < 0,005$ ) em relação ao grupo Sed (animais que receberam salina e não foram submetidos ao exercício) x Cg+Sed (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m. e não foram submetidos ao exercício), # ( $p < 0,005$ ) em relação ao grupo Cg+Sed x Cg+Ex (animais que receberam carragenina e foram submetidos ao exercício) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo Cg+Ex x Cg+Ex+Mino (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ L, i.m, foram exercitados e receberam minociclina, 30ng, i.t.),  $n=6$  por grupo. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Sal+Ex (animais que receberam salina e foram exercitados), Cg+AM630+Ex (animais que receberam injeção de carragenina 2%, 50 $\mu$ l, i.m., AM630, 4 $\mu$ g, i.t. e foram exercitados).

Fonte: Da autora.

## 6.DISCUSSÃO

O presente estudo verificou o efeito do exercício físico no controle da dor muscular e o envolvimento do CB<sub>2</sub> e da micróglia neste controle.

A administração intramuscular de carragenina em camundongos foi capaz de induzir uma redução no limiar de retirada da pata, sugerindo um quadro de alodínia mecânica, avaliado pelo teste de filamentos de Von frey (Gráfico 1). O mesmo resultado foi encontrado pelo teste da placa quente, demonstrando um quadro de hiperalgesia térmica (Gráfico 2). Estudos anteriores já haviam demonstrado que a carragenina induz dor muscular (KEHL et al, 2000; LORAM et al., 2007; RADHAKRISHNAN et al., 2003). Dina e colaboradores (2006) também demonstraram que a administração *i.m.* de carragenina resultou em um comportamento hipernociceptivo em ratos. A carragenina é um estímulo químico que evoca um modelo bem conhecido de inflamação cutânea responsável pela ativação de nociceptores musculares, pois libera substâncias como ATP, NO, bradicinina e citocinas pró-inflamatórias, as quais sensibilizam esses nociceptores (KEHL et al., 2000). Como observado em diversos trabalhos descritos na literatura, durante o desenvolvimento do processo inflamatório ocorre infiltração de células inflamatórias para o sítio lesionado (DELVES; ROITT, 2000; VIVIER; MALISSEN, 2006). Alguns trabalhos demonstraram que o aumento de células inflamatórias no sítio de lesão pode estar relacionado ao desenvolvimento de processos dolorosos (CUNHA et al., 2008; LAVICH et al., 2006). Alguns desses mediadores liberados sensibilizam a micróglia. Em nosso trabalho, a carragenina causou dor muscular, pois o limiar nociceptivo dos animais foi reduzido após a injeção intramuscular de carragenina no músculo gastrocnêmio direito.

Além disso, pode-se observar que os animais exercitados apresentaram uma redução da alodinia e da hiperalgesia muscular induzida pela carragenina, indicando que o treinamento físico produziu um efeito antinociceptivo. Esse fenômeno é conhecido com analgesia induzida pelo exercício, descrito por Kotyn (2002).

Nossos resultados corroboram com outros trabalhos que demonstram que em humanos, a hidroterapia contribui para a reabilitação de pacientes com dor (IMAMURA et al., 2001). Outro estudo encontrou que em pessoas portadoras de doenças musculoesqueléticas a natação diminuiu a dor e o edema na muscular

(BARKER et al., 2014). O exercício também aliviou a dor muscular em pacientes com dor muscular crônica de pescoço (ANDERSEN et al., 2007). Além disso, Alkatan e colaboradores (2016) demonstraram que a natação e o ciclismo reduziram a dor em pacientes com osteoartrite. Outro estudo demonstrou que o exercício físico de baixa intensidade (natação) promoveu uma diminuição da nocicepção química induzida por formalina. Em relação à nocicepção térmica, tanto a natação aguda como a crônica (7 e 28 dias) promoveram uma diminuição na nocicepção no teste da placa quente (BENTO-SILVA et al., 2010).

Em adição, Gonçalves e Luciano (1999), demonstram que ratos treinados em esteira ergométrica, apresentaram atenuação da resposta inflamatória induzida por injeção de carragenina, com conseqüente diminuição da dor, quando comparados com ratos sedentários. Outro achado verificou uma redução da dor neuropática em ratos, pelo exercício em esteira e pelo nado, o qual constatou que ambos os tratamentos são eficazes para atenuar a hiperalgesia e alodínia mecânica de forma significativa (LI et al., 2010). Além disso, o exercício físico também pode modificar o limiar de neurônios sensoriais a estímulos nociceptivos, ou seja, aumenta o limiar nociceptivo (MAZZARDO-MARTINS, 2010; KOLTYN, 2000).

Mazzardo-Martins e colaboradores (2010) demonstraram que o exercício de natação de alta intensidade, realizado por 30 min/dia por cinco dias, também reduziu a resposta nociceptiva em modelos de dor aguda. Além disso, Stagg e colaboradores (2011) avaliaram duas intensidades de caminhada na esteira e observaram que após a terceira semana apenas o exercício de maior intensidade diminuiu a hiperalgesia mecânica e térmica, similarmente aos nossos resultados. Já Bement e Sluka (2005), avaliaram um protocolo de realização de exercício de baixa intensidade por cinco dias em um modelo de dor muscular crônica, verificando que essa prática aumentou o limiar de resposta dos animais para a retirada da pata frente à estimulação mecânica. Desse modo, apesar de não avaliarmos a intensidade ao final do protocolo utilizado em nosso estudo, os prévios trabalhos têm demonstrado que o exercício tanto de baixa ou alta intensidade é capaz de controlar a nocicepção.

Os mecanismos responsáveis por essa antinocicepção ainda não foram muito bem elucidados. Uma das hipóteses mais aceitas é a influência do exercício na ativação de mediadores endógenos (noradrenalina, serotonina e peptídeos opióides) envolvidos no controle da dor (KOLTYN, 2000). Porém, os mecanismos pelos quais

ocorra esse efeito também pode envolver a teoria do controle do portão da dor e a inibição espinal (MELZACK & WALL, 1965). Outras teorias adicionais incluem, a ativação do córtex motor, com ativação da via descendente (HOEGGER-BEMENT et al, 2009). Esse controle pode ser também a nível medular, pela inibição da atividade da micróglia, envolvendo o sistema endocanabinóide, mais precisamente pela ativação de receptores CB<sub>2</sub>.

Neste contexto, buscamos avaliar a participação dos receptores CB<sub>2</sub>, administrando intratecalmente o antagonista AM630. Assim, nossos resultados demonstraram que o AM630 bloqueou a antinocicepção promovida pelo exercício nos animais com dor muscular em ambos os testes, Von Frey filamentos e placa quente (Gráficos 3 e 4). Isto corrobora com Lüdtke (2014) que demonstrou que no modelo de dor com CFA, a natação de alta intensidade promoveu antinocicepção, a qual foi revertida pela pré-administração *i.t.* de AM630.

Outros estudos têm demonstrado o envolvimento do receptor CB<sub>2</sub> no controle da dor. Fuss e colaboradores (2015) demonstraram que a administração do antagonista para CB<sub>2</sub>, o AM630, na pata, inibiu o aumento da sensibilidade térmica no teste da placa quente provocado pela corrida em camundongos. Já Zhang et al., (2014) demonstraram que a administração de um agonista para o receptor CB<sub>2</sub>, o LY3038404 HCl, por via oral, atenuou o comportamento de dor, aumentando consequentemente o limiar de retirada de pata no teste de Von frey filamentos e a sensibilidade térmica no teste da placa quente em ratos com pancreatite crônica.

Em adição, a ativação de receptores do tipo CB<sub>2</sub> expressos na micróglia durante a inflamação (ATWOOD & MACKIE, 2010) reduziu a liberação de NO e de TNF- $\alpha$  na micróglia (MERIGHI et al., 2012). ASHTON e colaboradores (2006) também demonstraram que receptores CB<sub>2</sub> expressos na micróglia de ratos e humanos reduzem a ativação microglial.

Além disso, Galdino e colaboradores (2014) demonstraram que a pré-administração *i.t.* de AM630 reverteu a antinocicepção promovida pelo exercício aeróbico em ratos. Sabe-se também que as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas dos agonistas do receptor canabinóides são expressas também após a ativação de receptores CB<sub>2</sub> (KLEIN; NEWTON, 2007; ROMERO-SANDOVAL et al., 2009). Estudos encontraram que agonistas para os receptores CB<sub>2</sub> são capazes de reduzir a produção de citocinas pelas células microgliais em modelos *in vitro* (MERIGHI et al., 2012) e, esse efeito contribuiu para o alívio de alguns sintomas

como hiperalgesia térmica e alodínia mecânica (MERIGHI *et al.*, 2012). Assim, sugerimos que o receptor CB<sub>2</sub> expresso na micróglia parece estar envolvido no controle da dor muscular promovido pelo treinamento físico.

Além disso, buscamos verificar a participação de endocanabinóides no controle da dor muscular promovido pela natação. Assim, demonstramos que o MAFP não apresentou nenhum efeito significativo sobre o efeito antinociceptivo encontrado nos animais com dor muscular submetidos ao exercício, avaliado pelo teste Von Frey filamentos (Gráfico 5). Já no teste da placa quente, o efeito antinociceptivo encontrado ao final do treinamento nos animais com dor muscular foi potencializado pelo MAFP (Gráfico 6). Isto corrobora com o estudo de Galdino e colaboradores (2014) que demonstraram que a injeção i.t. de MAFP potencializou e prolongou a antinocicepção induzida pelo exercício físico. Sendo assim, como não houve efeito no Von frey e este efeito foi potencializado no teste da placa quente, sugerimos que a antinocicepção pode depender do tipo de estímulo e do tipo de fibra ativada corroborando com os estudos de Yeomans & Proudfit (1996) que demonstraram que respostas nociceptivas podem ser ativadas por diferentes tipos de fibras (C e A $\delta$ ) e por diferentes nociceptores.

Em adição, estudos demonstram que a administração subcutânea de inibidores das enzimas FAAH e MGL, o URB597 e o URB602, respectivamente, reduziram também a alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, em um modelo de dor neuropática (DESROCHES *et al.*, 2014). O endocanabinóide sendo menos degradado pelo uso desses inibidores aparecerá em maior quantidade na fenda sináptica, favorecendo um maior efeito. Desse modo, sugerimos que a antinocicepção verificada após a administração do MAFP foi devido à uma maior oferta de endocanabinóide, provavelmente o 2-AG, o qual apresenta maior afinidade pelo receptor CB<sub>2</sub>, resultando em antinocicepção.

Já, para investigar o envolvimento da micróglia no controle da dor muscular induzido pelo exercício físico, foi pré-administrada a minociclina, uma droga inibidora seletiva da micróglia.

Assim, nossos resultados demonstraram que a minociclina não apresentou nenhum efeito significativo sobre a redução da nocicepção encontrada nos animais exercitados que apresentavam dor muscular, nem no teste Von Frey filamentos e nem no teste da placa quente (Gráficos 7 e 8). O treinamento físico promoveu uma reversão total da nocicepção nos animais com dor muscular e sugerimos que o

devido a esse efeito não foi possível verificar uma ação da minociclina. Entretanto, a pré-administração da minociclina promoveu uma redução da alodínia mecânica e da hiperalgesia térmica nos animais não exercitados que apresentavam dor muscular. A micróglia é muito importante para a gênese da dor muscular, pois ela é ativada durante a lesão tecidual, com conseqüente infiltração de células do sistema imune no local da agressão, com produção de citocinas e de quimiocinas (KRAYCHETE et al., 2006). Esses resultados corroboram com o estudo de Ferreira e colaboradores (2003) que demonstram que a minociclina bloqueia a resposta inflamatória e a dor reproduzidos pelo teste da formalina em camundongos, possivelmente por inibir a liberação de mediadores inflamatórios, tais como: histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e substância P, entre outros.

Além disso, um estudo demonstrou que a minociclina administrada na medula espinal e não sistemicamente, produziu antinocicepção por meio da inibição da enzima p38 microglial, uma enzima importante na síntese de citocinas pró-inflamatórias, em animais com lesões teciduais e com dor induzidas por inflamação periférica (HUA et al., 2005). Recentemente, os efeitos da minociclina com diminuição da alodínia e da hiperalgesia no teste de Von Frey filamentos e placa quente, respectivamente, têm sido demonstrados em modelos de artrite, transecção do nervo espinal e neurite inflamatória do isquiático (LEDEBOER et al., 2005; RAGHAVENDRA et al., 2003).

Além disso, esse estudo corrobora com outros estudos que demonstraram que a micróglia modula a atividade neuronal durante a dor muscular, pois quando ativadas por condições fisiopatológicas, elas liberam substâncias que modificam a sinalização entre os neurônios (FIELDS; STEVENS-GRAHAM, 2002; MARCHAND et al., 2005). Dentre essas substâncias incluem o NO, o ATP e citocinas pró-inflamatórias (MARCHAND et al., 2005). Em modelos animais, estudos tem demonstrado que quando a micróglia é inibida, a dor é atenuada e os níveis dessas substâncias são reduzidos (CHACUR et al., 2004; MILLIGAN et al., 2003).

Assim, por meio de tais achados, o presente estudo sugere que a reversão do efeito antinociceptivo encontrado no final da terceira semana do protocolo de natação nos animais com dor muscular e sedentários, foi pela ativação de receptores do tipo CB<sub>2</sub> a nível espinal, provavelmente em células microgliais.

O desenvolvimento da dor muscular pode envolver fatores imunorregulatórios tais como as citocinas. As citocinas são um grupo de proteínas que possuem um

papel importante ao mediar a resposta imunológica frente a patógenos e a injúria tecidual (PEAKE et al., 2005).

Sendo assim, o presente estudo também investigou a participação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , no modelo de dor muscular e o efeito do treinamento físico sobre os níveis dessas citocinas.

Watkins e Maier (2005) demonstraram que o processo doloroso libera alguns mediadores como substância P, bradicina e o NO, que ativam as células da glia, com posterior sensibilização da via nociceptiva a nível medular e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , as quais contribuem para a gênese e manutenção da dor. Além da glia, tais citocinas podem ser liberadas tanto a partir do local da lesão a nível periférico (MCMAHON et al, 2005; RAGHAVENDRA et al, 2004).

Assim, nossos resultados demonstraram que durante a dor muscular os níveis de TNF- $\alpha$  musculares ficaram aumentados nos animais não treinados (Gráfico 11). Lembrando que, o TNF- $\alpha$  é responsável pela gênese e manutenção da dor por ativar a micróglia a sintetizar e liberar novas citocinas (WATKINS; MAIER, 2005). Esse achado corrobora com os estudos de Mondeveanu e colaboradores (2001), que demonstram que após lesão, os níveis de TNF- $\alpha$  ficam aumentados, iniciando um processo de sensibilização local. Essa citocina é também responsável por induzir a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, promovendo, assim, a migração de leucócitos para os locais de inflamação, com liberação de mediadores álgicos, substância P, NO, bradicinina (MONDEVEANU et al., 2001).

O TNF- $\alpha$  ativa o fator-nuclear  $\kappa\beta$  (NF $\kappa\beta$ ), um complexo proteico responsável por regular a resposta imune, que conduz à ativação de diferentes genes para a transcrição de mediadores inflamatórios, levando a ativação microglial, com liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, resultado em dor (MARCHAND et al., 2005).

Também podemos sugerir o envolvimento da microglia na liberação do TNF- $\alpha$ , pois quando essa foi inibida pela minociclina nos animais com dor muscular sedentários, os níveis dessa citocina foram reduzidos. Lembrando que, o TNF- $\alpha$  é um mediador importante da sensibilização central e é liberado pela micróglia quando ela é sensibilizada por mediadores liberados no local da lesão (LEDEBOER et al., 2005; MARCHAND et al., 2005).

Outra importante citocina pró-inflamatória presente durante a lesão é a IL-1 $\beta$ . O mecanismo de ação da IL-1 $\beta$  na gênese da dor envolve a ativação da adenilato ciclase, provocando aumento do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) celular, com conseqüente ativação da proteína quinase A e fosforilação de proteínas intracelulares (RANG; URBAN, 1995).

Outros estudos demonstraram que IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  são regulados positivamente, ou seja, aumentados na medula espinhal e cérebro em modelo de nocicepção inflamatória por meio da administração de CFA (Adjuvante Completo de Freud) (RAGHAVENDRA et al., 2004).

Após o treinamento físico, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram reduzidos (Gráfico 11 e 12). Esses resultados corroboram com os estudos de Jankord e Jemiolo (2004), que demonstram que o exercício físico afeta a produção de citocinas, principalmente TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ .

Além disso, Yoo e colaboradores (2015) demonstraram que o exercício ergométrico diminui os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e a ativação microglial em ratos com diabetes tipo 2. Em adição, Bilski e colaboradores (2015) demonstraram que o exercício em esteira, reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e a inflamação em ratos com colite.

Assim, hipotetizamos que o exercício físico reduza os níveis de citocinas, pela regulação do sistema imune e pela inibição da micróglia.

A dor muscular gera um processo inflamatório com conseqüente aumento da temperatura local e dor. Assim, através desse contexto, utilizamos a análise termográfica como ferramenta indireta para a medida da dor muscular.

Nossos resultados demonstraram que os animais com dor muscular que não realizaram o treinamento físico apresentaram um aumento da temperatura local (Gráfico 13). Já nos animais com dor muscular e exercitados, esse aumento não foi verificado. Esses achados associados aos encontrados pelos testes nociceptivos e ao ensaio de ELISA, sugerem que o exercício diminuiu ou impediu o desenvolvimento do processo inflamatório muscular. Esse resultado corrobora com o estudo de Rossato (2009), o qual demonstrou que a natação diminuiu a inflamação induzida por zimosan em ratos, associada à diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e aumento de IL-10.

Além disso, os resultados do presente estudo encontraram que nos animais exercitados com dor muscular, a temperatura local aumentou após administração de

minociclina, sugerindo que a micróglia pode ser envolvida na termorregulação local, pois quando a micróglia foi bloqueada, a temperatura local nestes animais aumentou.

Como a micróglia induz inflamação e consequente aumento da temperatura, após o seu bloqueio pela minociclina, a temperatura deveria diminuir. Em contrapartida, a temperatura aumentou, pois, estudos demonstram que o TNF- $\alpha$  desempenha um papel criogênico endógeno na modulação da temperatura, onde Long e colaboradores (1992) demonstraram que a injeção sistêmica de TNF- $\alpha$  atenua a febre induzida por LPS em ratos. Já Leon e colaboradores (1997), demonstraram que em camundongos nocautes para o receptor de TNF- $\alpha$  a febre induzida por LPS é exacerbada. Em adição, Long e colaboradores (1990) demonstraram que a hipotermia induzida pelo estresse é reduzida por injeção sistêmica de anti-TNF- $\alpha$ , corroborando o efeito criogênico desta citocina. Assim, sugerimos que o aumento da temperatura verificado após a administração da minociclina pode ser devido à redução dos níveis de TNF- $\alpha$  promovido pelo treinamento físico.

## 7 CONCLUSÃO

Portanto, concluímos que o protocolo de treinamento físico proposto pelo presente estudo reduziu a dor muscular induzida pela carragenina. Além disso, sugerimos que os receptores CB<sub>2</sub> participam desse efeito e a micróglia parece estar envolvida na gênese e manutenção da dor muscular, com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

## REFERÊNCIAS

- ALKATAN, M. et al. Improved function and reduced pain after swimming and cycling training in patients with osteoarthritis. **J Rheumatol**, 2016.
- ALLIOT, F. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 1541–1545, 1991.
- ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, v. 36, p. 165-179, 2001.
- AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Prog Neurobiol**, v. 4, p. 315-348, 1999.
- ANDERSEN, J. H.; HAAHR, J. P.; FROST, P. Risk factors for more severe regional musculoskeletal symptoms: a two-year prospective study of a general working population. **Arthritis Rheum**, v. 4, p. 1355-1364, 2007.
- ARAQUE, A. et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci**, v. 22, p. 208-215, 1999.
- ASENSIO, V. C.; CAMPBELL, I. L. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. **Trends Neurosci**, v. 11, p. 504-512, 1999.
- ASHTON J. C. et al. Expression of the cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. **Neurosci Lett**, v. 2, p. 113-116, 2006.
- ATWOOD BK, MACKIE K. CB<sub>2</sub>: a cannabinoid receptor with an identity crisis. **Br J Pharmacol**, v. 160, p. 467-479, 2010.
- BARKER, A.L. et al. Effectiveness of aquatic exercise for musculoskeletal conditions: A Meta-Analysis. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 9, p. 1776-1786, 2014.
- BAZAN, J. F. et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C. **Nature**, v. 385, p.640–644,1997.
- BEMENT, M.K.H.; SLUKA K.A. Low-Intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 86, p. 1736-1740, 2005.

BENDER, D. **Gastrocnemius muscle of rats**. Disponível em: <<http://david-bender.purplecloud.net/metonline/central/musclefuels/fuels5.htm>>, 2012. Acesso em: 12 Dec. 2015.

BENITO C. et al. Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors in human brain inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 153, p. 277-285, 2008.

BENTO-SILVA, T. M.; SANTOS, M. A. P.; ALMEIDA, F. R. C. Treinamento físico de intensidade leve diminui nocicepção induzida por estímulos térmico e químico em ratos. **Rev Bras Biomotric**, v. 4, 2010.

BERNARDI, A. et al. The antiproliferative effect of Indomethacin loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation differentiation, and the inhibition of survival pathways. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 711-729, 2013.

BESONG G. et al. Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits the production of rantes in glial cell cultures. **J Neurosci**, v. 22, p. 5403-5411, 2002.

BILSKI J. et al. Moderate exercise training attenuates the severity of experimental rodent colitis: the importance of crosstalk between adipose tissue and skeletal muscles. **Mediators Inflamm**, 2015.

BOOTH, M. L., et al. Physical activity preferences, preferred sources of assistance, and perceived barriers to increased activity among physically inactive Australians. **Prev Med**, v. 26, p. 131-137, 1997.

BRATTI, T. **Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos**. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, 2011.

BRIERLEY, J. B, BROWN, A. W. The origin of lipid phagocytes in the central nervous system: The intrinsic microglia. **J Comp Neurol**, v. 4, p. 397-406, 1982.

CABRAL G. A. et al. Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB<sub>1</sub> receptor participation. **Adv Exp Med Biol**, v. 493, p. 207-214, 2001.

CAMPION, M. **Hidroterapia: princípios e prática**. São Paulo: Manole, 2000.

CARDONA, A. E. et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. **Nat Neurosci**, v. 7, p. 917-924, 2006.

CASPERSEN, C. J. MATHHEW, M. Z. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinction for health- relates research. **Public Health Rep.** v. 100, p.172-179, 1985.

CHACUR, M. et al. Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators. **Pain**, v. 1, p. 65-76, 2004.

CHACUR, M.; HOHEISEL, U.; MENSE, S. Sind spinale mikrogliazellen na der entstehung chronischer muskelschmerzen beteiligt? **German Pain Congress**, p. 14, 2007.

CHACUR, M. et al. Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitization: an immunohistochemical and behavior study in rats. **Eur j Pain**, v. 9, p. 915-923, 2009.

CHAN, W.Y.; KOHSAKAB, S.; REZAIEC, P. Review The origin and cell lineage of microglia—New concepts. **Brain Res Rev**, v. 53, p. 344-354, 2007.

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, v. 353, p. 2233-2237, 1999.

CLARK, A. K. et al. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2007.

COBIANCHI S. et al. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v. 16, p. 273-287, 2010.

CONDIE, R. et al. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine t-cell line, el4.IL-2. **J Biol Chem**, v. 22, p. 13175–13183, 1996.

CORREA, F. et al. Activation of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor negatively regulates IL-12 p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. **Br J Pharmacol**, v. 145, p. 441–448, 2005.

CORREA, F. et al. Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB<sub>2</sub> receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. **Glia**, v. 58, p. 135–147, 2010.

COULL JA. et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. **Nature**, v. 15, p. 1017-1021, 2005.

COYLE, D. E. Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. **Glia**, v. 23, p. 75-83, 1998.

CUNHA, T. M. et al. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. **Br J Pharmacol**, v. 154, p. 460-470, 2008.

DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. High prevalence of adherent invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. **Gastroenterol**, v. 127, p. 412-21, 2004.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. Second of two parts. **N Engl J Med**, v. 2, p. 108-117, 2000.

DESROCHES, J. et al. Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. **Neuropharmacol**, v. 77, p. 441-452, 2014.

DEY, S.; SINGH, R. H.; DEY, P. K. Exercise training: significance of regional alterations in serotonin metabolism of rat brain in relation to antidepressant effect of exercise. **Physiol Behav**, v. 6, p. 1095-1099, 1992.

DI MARZO, V. et al. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends Neurosci**, v. 21, p.521–528, 1998.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, p. 771-784, 2004.

DINA, O. A.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. **Neuroscience**, v. 152, p. 521-525, 2006.

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia**, v. 2, p. 180-190, 2001.

DOGRUL, A. et al. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychi**, v. 1, p. 97-105, 2012.

DROSTE, C. et al. Experimental pain thresholds and plasma beta-endorphin levels during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 3, p. 334-342, 1991.

EHRHART, J. et al. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB<sub>2</sub>) suppresses microglial activation. **J Neuroinflammation**, v. 2, p. 29, 2005.

ELJASCHEWITSCH, E. et al. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. **Neuron**, v. 49, p. 67-79, 2006.

FERNANDEZ-RUIZ, J. et al. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? **Trends Pharmacol Sci**, v. 28, p. 39-44, 2007.

FERREIRA, D. S. et al. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Rev Bras Farm**, v. 84, p. 47-49, 2003.

FIELDS, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New Insights into Neuron-Glia Communication. **Science**, v. 298, p. 556-562, 2002.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; HEINRICHER, M. M. **Central nervous system mechanisms of pain modulation**. In: Wall, Melzack, (Eds.), Text book of Pain. 5<sup>a</sup> ed., Elsevier, 2005.

FU, K. Y.; LIGHT, A. R.; MAIXNER, W. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. **Neurosci**, v. 4, p. 1127-1135, 2000.

FUSS J. et al. A runner's high depends on cannabinoid receptors in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 42, p. 13105-13108, 2015.

GALDINO, G. et al. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. **Neuropharmacol**, v.77, p. 313-324, 2014.

GARRISON, C. J. et al. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. **Brain Res**, v. 1, p. 1-7, 1991.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 1, p. 21-27, 2001.

GONÇALVES, A. L.; LUCIANO, E. Respostas inflamatórias em ratos Wistar submetidos a atividade física. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, v. 4, p. 39-46, 1999.

GOWANS, S. E.; DE HUECK, A. Effectiveness of exercise in management of fibromyalgia **Curr Opin Rheumatol**, v. 16, p. 138-142, 2004.

GRIFFIS, C. A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leukocyte cellular adhesion molecules. **Biol Res Nurs**, v. 4, p. 297-312, 2006.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. The endocannabinoid system and pain. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 6, p. 403-421, 2009.

HANSSON, E. Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation? **Acta Physiol**, v. 1, p. 321-327, 2006.

HEIDLAND, A. et al. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? **J Nephrol**, v. 19, n. 10, p. 102-109, 2006.

HERKENHAM M. et al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 5, p. 1932-1936, 1990.

HOEGER-BEMENT, M. K. et al. Fatiguing exercise attenuates pain-induced corticomotor excitability. **Neurosci Lett**, v. 2, p. 209-213, 2009.

HOWLETT, A. C. et al. The cannabinoid receptor: Biochemical, anatomical and behavioral characterization. **Trends Neurosci**, v. 13, p. 420-423, 1990.

HUA, X. Y. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. **Eur J Neurosci**, v. 22, p. 2431–2440, 2005.

HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. **Curr. Neuropharmacol**, v. 4, p. 197-206, 2006.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling pathways in sensitization: Toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, v. 55, p. 365-376, 2007.

HUTCHINSON, K. J. et al. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. **Brain**, v. 6, p. 1403-1414, 2004.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol**, v. 67, p.313-316, 1980.

IMAMURA M. et al. Repeated thermal therapy improves impaired vascular endothelial function in patients with coronary risk factors. **J Am Coll Cardiol**, v. 38, p.1083-1088, 2001.

JANAL, M. N. et al. Pain sensitivity, mood and plasma endocrine levels in man following long-distance running: effects of naloxone. **Pain**, v. 1, p. 13-25, 1984.

JANAL, M. N. et al. Are runners stoical? An examination of pain sensitivity in habitual runners and normally active controls. **Pain**, v. 1, p. 109-116, 1994.

JANKORD, R.; JEMIOLO, B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL- 10 levels in healthy older men. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, p. 960-964, 2004.

JAWEED, M. M.; HERBISON, G. J.; DITURNNO, J. F. Effect of swimming on compensatory hypertrophy of reinnervating soleus and plantaris muscle. **Am. J. Phys. Med**, v. 53, p. 35-40, 1974.

JUHL, G. I. et al. Central sensitization phenomena after third molar surgery: a quantitative sensory testing study. **Eur J Pain**, v. 12, p. 116-127, 2008.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 43, p. 203-210, 2001.

JUNG, S. et al. Analysis of Fractalkine Receptor CX<sub>3</sub>CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. **Mol Cell Biol**, v. 11, p. 4106-4114, 2000.

JUNG, J. S. Anti-inflammatory mechanism of ginsenoside Rh1 in lipopolysaccharide-stimulated microglia: critical role of the protein kinase A pathway and hemeoxygenase-1 expression. **J Neurochem**, v. 6, p. 1668-1680, 2010.

KEHL, L.J.; TREMPE, T.M.; HARGREAVES, K.M. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. **Pain**, v. 85, p. 333-343, 2000.

KEMPPAINEN, P. et al. Modification of dental pain and cutaneous thermal sensitivity by physical exercise in man. **Brain Res**, v. 1, p. 33-40, 1985.

KHOURY, J. et al. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. **Nat Med**, v. 4, p. 432-438, 2011.

KLEGERIS, A.; BISSONNETTE, C. J.; MCGEER, P. L. Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB<sub>2</sub> receptor. **Br J Pharmacol**, v. 139, p. 775–786, 2003.

KLEIN, T. W. et al. The cannabinoid system and cytokine network. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 225, p. 1–8, 2000.

KLEIN, T. W.; NEWTON, C. A. Therapeutic potential of cannabinoid-based drugs. **Adv Exp Med Biol**, v. 601, p. 395–413, 2007.

KOLTYN, K. F. Analgesia following exercise: a review. **Sports Med**, v.29, p. 85-98, 2000.

KOLTYN, K. F. Exercise-induced hypoalgesia and intensity of exercise. **Sports Med**, v. 32, p. 477-487, 2002.

KRAYCHETE, D. C. et al. Pro-inflammatory cytokines and pain. **Rev. Bras. Reumatol**, v. 3, p. 199-206, 2006.

KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci**, v. 19, p. 312-318, 1996.

KUPHAL, K. E.; FIBUCH, E. E.; TAYLOR, B. K. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. **J Pain**, v. 8, p. 989-997, 2007.

LAVICH, T. R. et al. Neutrophil infiltration is implicated in the sustained thermal hyperalgesic response evoked by allergen provocation in actively sensitized rats. **Pain**, v. 125, p. 180-187, 2006.

LEDEBOER, A. et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 1, p. 71-83, 2005.

LEON, L. R. et al. Exacerbated febrile response to LPS, but not turpentine in TNF double receptor knockout mice. **Am. J. Physiol**, v. 272, p. 563-569, 1997.

LI, L.; HONDZINSKI, J. M. Select exercise modalities may reverse movement dysfunction because of peripheral neuropathy. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 3, p. 133-137, 2012.

LI, Y.T. et al. Treatment with swimming and treadmill exercises reduced neuropathic pain on chronic constriction injury of sciatic nerve of rats. **FASEB J**, v. 24, p. 618-625, 2010.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D, The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 3, p. 473-477, 2008.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LONG, N. C. et al. Roles of interleukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. **Am. J. Physiol**, v. 259, p. R724-R728, 1990.

LONG, N. C. et al. Systemic injection of TNF-alpha attenuates fever due to IL-1 beta and LPS in rats. **Am J Physiol**, v. 263, p. R987-R991, 1992.

LONGHI-BALBINOT, D.T. **Análise dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do triterpeno 3,6,16-tridroxilup-20 (29)-eno (TTHL) isolado de Combretum leprosum**. 2009.106 f. Tese (Doutorado em Biologia). Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. 2009.

LORAM, L. C. et al. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **J Pain**, v. 8, p. 127-136, 2007.

LÜDTKE, D. D. **Análise do envolvimento do sistema canabinoide na analgesia induzida pelo exercício físico em um modelo animal de dor inflamatória**. 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia). Universidade do Sul de Santa Catarina, 2014.

LUONGO, L. et al. 1-(2',4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-cyclohexylamine-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide, a novel CB2 agonist, alleviates neuropathic pain through functional microglial changes in mice. **Neurobiol Dis**, v. 1, p. 177-185, 2010.

LYNN, A. B.; HERKENHAM, M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 3, p. 1612-1623, 1994.

MA, J. Y.; ZHAO, Z. Q. The involvement of glia in long-term plasticity in the spinal dorsal horn of the rat. **Neuroreport**, v. 13, p. 1781-1784, 2002.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, p. 521-532, 2005.

MARESZ, K. et al. Modulation of the cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. **J Neurochem**, v. 95, p. 437-445, 2005.

MARÍN-TEVA, J. L. et al. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. **Glia**, v. 36, p. 165-179, 2001.

MARRIOTT, I. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses. **Front Biosci**, v. 9, p. 2153-2160, 2004.

MARTIN, B. R.; LICHTMAN, A. H. Cannabinoid transmission and pain perception. **Neurobiol Dis**, v. 6, p. 447-461, 1998.

MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHAFF, P. L. **Bioquímica do Exercício e do treinamento**. São Paulo: Manole, 2000.

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. High-Intensity Extended Swimming Exercise Reduces Pain-Related Behavior in Mice: Involvement of Endogenous Opioids and the Serotonergic System. **J Pain**, 2010.

MCCMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B., MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp Neurol**, v. 2, p. 444-462, 2005.

MELLER ST. et al. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacol**, v. 11, p. 1471–1478, 1994.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, 1965.

MENSE, S. Referral of muscle pain: new aspects. **Am. Pain Soc**, v. 3, p. 1-9, 1994.

MENSE, S. Pathophysiologic basis of muscle pain syndromes. **Phys Med Rehabil Clin North Am**, v. 8, p. 23- 53, 1997.

MENSE, S., SCHMIDT, R.F. **Muscle pain: which receptors are responsible for the transmission of noxious stimuli?** In: Clifford, R.F., ed. Physiological aspects of clinical neurology. Oxford, Blackwell, p.265-78, 1977.

MERIGHI, S. et al. Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor attenuates morphine-induced inflammatory responses in activated microglial cells. **Br J Pharmacol**, v. 8, p. 2371-2385, 2012.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 1, p. 1-164, 1999.

MILLIGAN, E. D. et al. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intratecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp 120. **Brain Res**, v. 1, p. 105-116, 2000.

MILLIGAN, E. D. et al. The potential role of fractalkine, a neural chemokine, in creating spinally mediated exaggerated pain states. **J Pain Suppl**, v. 2, p. 30, 2002.

MILLIGAN, E. D. et al. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. **J Neurosci**, v. 3, p. 1026-1040, 2003.

MILLIGAN, E. D. et al. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. **Eur J Neurosci**, v. 9, p. 2294-2302, 2004.

MOLINA-HOLGADO, F. et al. Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-alpha responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. **Neuroreport**, v. 8, p. 1929-1933, 1997.

MOLINA-HOLGADO, F. et al. Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. **J Neurosci Res**, v. 6, p. 829-836, 2002.

MOLDOVEANU, A. I. et al. The Cytokine Response to Physical Activity and Training. **Sports Med**, v. 31, p. 115-144, 2001.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, p. 61-65, 1993.

NESIC, O. et al. Transcriptional profiling of spinal cord injury-induced central neuropathic pain. **J Neurochem**, v. 4, p. 998-1014, 2005.

NUNEZ, E. et al. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. **Synapse**, v. 4, p. 208-213, 2004.

O'CONNOR, P. J.; COOK, D. B. Exercise and pain: the neurobiology, measurement, and laboratory study of pain in relation to exercise in humans. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 27, p. 119-166, 1999.

OHSAWA, K. et al. Involvement of iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/ microglia. **J Cell Sci**, v. 113, p. 3073-3084, 2000.

OHSAWA, K. et al. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. **J Neurochem**, v. 88, p. 844-856, 2004.

OLIVEIRA, H. U. **Investigação do envolvimento do sistema endocanabinoide na antinocicepção induzida pela estimulação elétrica transcutânea do nervo-TENS**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal de Alfenas, 2015.

PADAWER, W. J.; LEVINE, F. M. Exercise-induced analgesia: fact or artifact? **Pain**, v. 2, p. 131-135, 1992.

PAN, Y. et al. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. **Nature**, v. 387, p. 611–617, 1997.

PEAKE, J. M. et al. Exercise-Induced Muscle Damage, Plasma Cytokines, and Markers of Neutrophil Activation. **Med Sci Sports Exerc**, v. 37, p. 737-745, 2005.

PERRY, V. H.; GORDON, S. Macrophages and microglia in the nervous system. **Trends Neurosci**, v. 6, p. 273-277, 1988.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid receptors and pain. **Prog Neurobiol**, v. 5, p. 569-611, 2001.

PERTWEE, R. G. Cannabinoids and multiple sclerosis. **Pharmacol Ther**, v. 95, p. 165-174, 2002.

PERTWEE, R.G. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. **Pharmacol Rev**, v. 62, p. 588–631, 2010.

PETERS, A.; SANFORD, L. P.; WEBSTER, H. de F. The fine structure of the nervous system. **London**, 1976.

PIOMELLI D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v.11, p.873-874, 2003.

POPE, C.; PARSONS, L. Endocannabinoid signaling in neurotoxicity and neuroprotection. **Neurotoxicol**, v. 32, p. 515-530, 2010.

POPOVICH, P. G.; YU, J. Y.; WHITACRE, C. C. Spinal cord neuropathology in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: modulation by oral administration of myelin basic protein. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 12, p. 1323-1338, 1997.

PRILLER, J. et al. Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. **Glia**, v. 4, p. 447-457, 1995.

PUFFENBARGER, R. A. et al. Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. **Glia**, v.29, p. 58–69, 2000.

RACZ, I. et al. Interferon-gamma is a critical modulator of cb (2) cannabinoid receptor signaling during neuropathic pain. **J Neurosci**, v. 67, p.711-716, 2008.

RADHAKRISHNAN, R.; MOORE, S. A.; SLUKA, K. A. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. **Pain**, v. 3, p. 567-577, 2003.

RAGHAVENDRA, V. et al. Anti-hyperalgesic and morphine-sparing actions of propentofylline following peripheral nerve injury in rats: mechanistic implications of spinal glia and proinflammatory cytokines. **Pain**, v. 3, p. 655-664, 2003.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F. Y.; DELEO, J. A. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. **Eur J Neurosci**, v. 2, p. 467-473, 2004.

RAMIREZ, B. G. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. **J Neurosci**, v. 8, p. 1904-1913, 2005.

RANG, H. P.; URBAN, L. New molecules in analgesia. **Br J Anaesth**, v. 75, p. 145-156, 1995.

RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. **J Ethnopharmacol**, v. 114, p. 78-85, 2007.

REDDINGTON, M. et al. Astrocytes and microglia as potential targets for calcitonin gene related peptide in the central nervous system. **J Physiol Pharmacol**, v. 7, p. 1047-1049, 1995.

RICHARDSON, J. D. Cannabinoids modulate pain by multiple mechanisms of action. **J Pain**, v.1, p. 2–14, 2000.

ROCK, R. B. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 4, p. 942-964, 2004.

ROMERO-SANDOVAL, A.; EISENACH, J. C. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. **Anesthesiol**, v. 106, p. 787-794, 2007.

ROMERO-SANDOVAL, M.D. et al. A Comparison of Spinal Iba1 and GFAP expression in Rodent Models of Acute and Chronic Pain. **Brain Res**, v. 1219, p. 116-126, 2008.

ROMERO-SANDOVAL EA. et al. Cannabinoid receptor type 2 activation induces a microglial anti-inflammatory phenotype and reduces migration via MKP induction and ERK dephosphorylation. **Mol Pain**, v. 5, p. 25, 2009.

ROSSATO, J. S. **Papel do sistema nervoso simpático sobre metabolismo e na resposta imunológica de monócitos circulantes de ratos durante o exercício agudo de intensidade moderada (natação)**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ROUMIER, A. et al. Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. **J Neurosci**, v. 50, p. 11421-11428, 2004.

SÁNCHEZ C. et al. Inhibition of glioma growth In Vivo by selective activation of the CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor. **Cancer Res**, v. 61, p. 5784-5789, 2001.

SATO, M. Binding of Toll-Like Receptor 2 to Zymosan, and Zymosan-Induced NF- $\kappa$ B Activation and TNF- $\alpha$  Secretion Are Down-Regulated by Lung Collectin Surfactant Protein A. **J Immunol**, v. 171, p. 417-425, 2003.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J; The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci**, v. 10, p. 1361-1368, 2007.

SHAOHAMI, E. et al. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. **J Neuroimmunol**, v. 72, p. 169-177, 1997.

SHENG, W. S. et al. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. **Glia**, v. 2, p. 212-219, 2005.

SOMJEN, G. G. Neuroglia and spinal fluids. **J Exp Biol**, v. 95, p. 129-133, 1981.

SONG, P.; ZHAO, Z. Q. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. **Neurosci Res**, v. 3, p. 281-286, 2001.

SPARLING, P.B. et al. Exercise activates the endocannabinoid system. **Neuroreport**, v.17, p. 2209-2211, 2003.

SROGA, J. M. et al. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. **J Comp Neurol**, v. 2, p. 223-240, 2003.

STAGG, N.J. et al. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model. **Anesthesiol**, v. 114, p. 940-948, 2011.

STREIT, W. J; WALTER, S. A.; PENNEL, N. A. Reactive microgliosis. **Prog Neurobiol**, v. 57, p. 563-581, 1999.

SUN, S. et al. New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. **Pain**, v. 1, p. 64-75, 2007.

SWEITZER SM et al. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1beta expression that correlates with pain behavior in the rat. **Brain**, v. 1, p. 209-221, 1999.

TEIXEIRA, M.J. **Fisiopatologia da dor neuropática**. Rev. Med. (São Paulo), v. 78, p. 53-84, 1999.

TROWBRIDGE, O, H; EMLING, C, R. **Inflamação**: uma revisão do processo. São Paulo: Quintessence Publishing Inc, 1998.

TSUDA, M. et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature**, v. 14, p. 778-783, 2003.

TURNER, T.A. Thermography as aid to the clinical lameness evaluation. **Vet Clin Nort Amer Equi Pract**, v.7, p.311-338. 1991.

US CENSUS BUREAU. **The 2009 statistical abstract of the United States: Commerce Department**, Census Bureau (publ.). Washington, DC, 2009.

VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Med Clin North Am**, v. 1, p. 1-12, 2007.

VAN SICKLE, M. D. et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors. **Science**, v. 310, p. 329–332, 2005.

VARON, S. S.; SOMJEN, G. G. Neuron-glia interactions. **Neurosci Res Program Bull**, v. 1, p. 1-239, 1979.

VERGE, G. M. et al. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. **Eur J Neurosci**, v. 5, p. 1950-1960, 2004.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20, p. 73–80, 2008.

VILA, M. et al. The role of glial cells in Parkinson's disease. **Curr Opin Neurol**, v. 14, p. 483-489, 2001.

VIVIER, E.; MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nat Immunol**, v. 1, p. 17-21, 2006.

WALL, P.D., GUTNICK, M. Properties of afferent nerve impulses originating from neuroma. **Nature**. v, 248, p. 740-743, 1974.

WALTER, L. et al. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. **J Neurosci**, v. 4, p. 1398-1405, 2003.

WATTERS, J. J. et al. A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling: the MEK/ERK pathway is not essential for nitric oxide and interleukin 1beta production. **J Biol Chem**, v. 277, p. 9077–9087, 2002.

WATKINS, L. R. et al. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. **Pain**, v. 3, p. 225-235, 1997.

WATKINS, L. R. et al. Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 14, p. 7710-7713, 1999.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. **Annu Rev Psychol**, v. 51, p. 29-57, 2000.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neurosci**, v. 24, p. 450-5, 2001.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol Rev**, v. 4, p. 981-1011, 2002.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, p. 973-985, 2003.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain. **J Intern Med**, v. 2, p. 139-155, 2005.

WOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1769, 2000.

WRIGHT, A.; SLUKA, K. A. Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain. **Clin J Pain**, v. 17, p. 33-46, 2001.

YATES, M. L.; BARKER, E. L. Organized trafficking of anandamide and related lipids. **Vitam Horm**, v. 81, p. 25-53, 2009.

YEOMANS, D. C.; PROUDFIT, H. K. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: behavioral evidence. **Pain**, v. 1, p. 133-140, 1996.

YOO, D. Y. et al. Treadmill exercise is associated with reduction of reactive microgliosis and pro-inflammatory cytokine levels in the hippocampus of type 2 diabetic rats. **Neurol Res**, v. 8, p. 732-738, 2015.

ZAI, L. J.; WRATHALL, J. R. Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. **Neurosci Res**, v. 3, p. 281-286, 2001.

ZHANG, Q. et al. Lead-induced cell signaling cascades in GT1-7 cells. **Brain Res Bull**, v. 61, p. 207-217, 2003.

ZHANG, L. et al. Cannabinoid receptor 2 agonist attenuates pain related behavior in rats with chronic alcohol/high fat diet induced pancreatitis. **Pain**, v. 10, p. 66, 2014.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. (Guest Editorial). **Pain**, v. 16, p. 109–110, 1983.

ZIMMERMANN, M. Physiological mechanisms of pain in the musculo-skeletal system. Muscle spasms and pain. **Caern Pather Publi**, p.7-17, 1988.

**ANEXO**

## Anexo A: Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA/UNIFAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 708 - Alfenas/MG - CEP 13130-008  
Fone: (35) 3296-1308 Fax: (35) 3296-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 628/2015, sob responsabilidade de Giovane Galdino de Souza, referente ao projeto "Investigação da participação de receptores canabinóides em células da glia no controle da dor muscular pelo exercício físico", está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UNIFAL) em 16 de abril de 2015.

Alfenas, 17 de abril de 2015.

Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira  
Presidente CEUA/UNIFAL