

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Franciane Bobinski

**EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE NA
TERAPÊUTICA DA DOR NEUROPÁTICA E REGENERAÇÃO
NERVOSA PERIFÉRICA: EFEITOS NEUROBIOLÓGICOS E
ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bobinski, Franciane

Exercício físico de baixa intensidade na terapêutica da dor neuropática e regeneração nervosa periférica: efeitos neurobiológicos e estudo dos mecanismos de ação / Franciane Bobinski ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos - Florianópolis, SC, 2015.
199 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

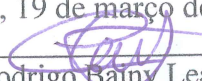
1. Neurociências. 2. Exercício físico. 3. Dor neuropática. 4. Lesão do nervo isquiático. 5. Regeneração nervosa. I. Santos, Adair Roberto Soares dos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

FRANCIANE BOBINSKI

**“EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE NA
TERAPÊUTICA DA DOR NEUROPÁTICA E
REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA: EFEITOS
NEUROBIOLÓGICOS E ESTUDO DOS MECANISMOS
DE AÇÃO”.**

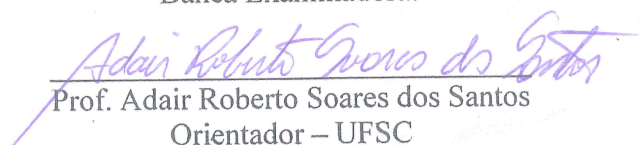
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia do
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 19 de março de 2015.




Prof. Rodrigo Banny Leal
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:




Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC



Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC



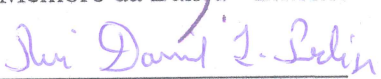
Prof. Luiz Fernando F. Royes
Membro da Banca - Externo



Prof. Tânia Silvia Fröde
Membro - UFSC



Prof. Josimari M. de Santana
Membro da Banca - Externo



Prof. Rui Daniel S. Prediger
Membro – UFSC



Prof. Daniel F. Martins
Membro suplente- Externo

Dedico esta tese aos meus pais Elaine
e Amilto Bobinski, pelo amor,
paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, pela minha vida, desafios, oportunidades, obstáculos e conquistas.

A minha família, meus pais Alaine e Amilto, obrigada pelo apoio, segurança, incentivo, paciência, dedicação, responsabilidade com a minha formação e acima de tudo ao amor incondicional em todas as fases da minha vida; ao meu irmão Giovane e cunhada Denilce, obrigada por todos os momentos de incentivo, amizade e apoio, vocês contribuíram muito para a minha formação. Amo vocês!

Ao professor Dr. Adair R. S. Santos, por ter me convidado a conhecer o laboratório e com isso, me apresentado ao mundo científico. Obrigada também pelos ensinamentos, suporte financeiro, correção da tese e artigos, por sempre se preocupar em proporcionar boas condições para a realização dos experimentos e principalmente por acreditar e investir no meu trabalho.

A professora Dra. Kathleen A. Sluka, por abrir as portas do seu laboratório experimental na Universidade de Iowa/EUA e colaborar financeiramente, e principalmente, com o seu conhecimento científico para o aprimoramento deste trabalho. Também, as técnicas de laboratório, Lynn, Sandra e Jing pelo auxílio técnico, amizade e momentos de descontração durante o período em Iowa City.

Aos grandes amigos que fiz na Universidade de Iowa, Lucindo, por todo o auxílio quando cheguei ao laboratório e nas questões burocráticas da Universidade, e também a Juliana (minha querida amiga) pela colaboração na parte experimental e principalmente, a ambos, pelos momentos de gargalhadas, suporte emocional e amizade.

A toda família Bocchese, em especial ao Daniel, pela grande amizade, incentivo e motivação em todas as fases da minha formação.

Aos amigos, colegas e ex-colegas do Landi, Daniel e Leidi, obrigada pelo incentivo inicial, por idealizar o estudo com o exercício físico e pelos ensinamentos desde a fase de mestrado; Tati, obrigada por ter compartilhado comigo, no período do mestrado, as salas de experimento, os animais, os instrumentos, e no período do doutorado,

por ter aberto as portas da sua casa pra mim e pela grande amizade; Morgana, obrigada pela grande amizade, pelos ensinamentos no laboratório, por me auxiliar em todas as etapas do doutorado-sanduíche e por me apresentar seus amigos de Iowa que se tornaram meus também; Deise, obrigada por compartilhar o seu conhecimento comigo, pelas correções na escrita da tese e também por ter sido uma grande *roommate*! Ana Paula, Fernandinha e Marina “Neninha”, obrigada por sempre estarem dispostas a ajudar nos experimentos e nos momentos de apuro no Landi; aos demais amigos e colegas, Ney, Débora, Fábio “Gaúcho”, Cris Baggio, Chico, Ari, Serginho, Murilo, Thaís, Róli, Carol, Igor, Stellinha, Tátilla, Rafaela, Dani e Jhônatas pela troca de conhecimentos, companheirismo, *Landi's Gourmet* e acima de tudo pela grande amizade que vou levar pra vida toda. Todos vocês foram muito importantes para a concretização deste trabalho.

Ao Josiel, disposto a dividir todos os momentos comigo, obrigada pela motivação, auxílio técnico e científico na escrita da tese e no desenho final, parceria, amizade e carinho que tem dedicado a mim.

Ao professor Dr. Cláudio da Cunha e a Dr. Patrícia A. Dombrowski, da Universidade Federal do Paraná e também, as professoras Dr. Cristina Martins-Silva, Dr. Rita Gomes Wanderley Pires e sua aluna Tamara Ferreira, da Universidade Federal do Espírito Santo, pelas importantes colaborações no meu trabalho, principalmente na parte experimental.

Aos membros da banca, professores Dra. Josimari Melo de Santana da Universidade Federal de Sergipe e Dr. Luiz Fernando Freire Royes da Universidade Federal de Santa Maria, por prontamente aceitarem revisar o meu trabalho e se deslocar para Florianópolis para a defesa desta tese. E também aos professores Dr. Rui Daniel S. Prediger, Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues e Dra. Tânia Silvia Fröde, da UFSC e ao Dr. Daniel Fernandes Martins da Unisul pelo aceite em participar desta etapa de revisão e banca de defesa.

A empresa *Mind the Graph* por disponibilizar o acesso gratuito ao site <http://mindthegraph.com/> para a montagem da figura de conclusão desta tese.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, seu Carlos e dona Vilma, pelos momentos de descontração e ajuda no

decorrer do doutorado. Em especial ao Nivaldo, por estar sempre a disposição para solucionar os assuntos burocráticos e problemáticos do curso.

A UFSC e a *Iowa University* pela estrutura oferecida. Também à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro durante o doutorado no Brasil e através do programa *Ciência sem Fronteiras*, durante o doutorado-sanduíche nos Estados Unidos.

Aos animais de laboratório, instrumentos de meu trabalho, todo o meu agradecimento e respeito.

De maneira geral, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, a ajuda de vocês foi fundamental.

Muito obrigada!

“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw (1856 – 1950)

RESUMO

A dor neuropática que surge em decorrência da lesão de nervos espinais é caracterizada por uma resposta anormal das vias de transmissão da dor. Além disso, as alterações geradas pela desnervação muscular prejudicam a função motora, que juntamente com a dor neuropática diminuem a qualidade de vida dos pacientes. O exercício físico regular é capaz de beneficiar positivamente a saúde física e mental, melhorando a qualidade de vida e diminuindo a incidência de doenças crônicas relacionadas ao estilo de vida sedentário. O exercício físico também é eficaz na reabilitação de pacientes após lesões de nervos espinais, por manter as propriedades musculares e promover a recuperação funcional. No entanto, apesar da grande relevância clínica, poucos estudos identificaram o efeito benéfico do exercício na dor neuropática e recuperação funcional, bem como os seus mecanismos neurobiológicos. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito anti-hiperalgésico e neuroregenerativo do exercício físico de baixa intensidade, realizado na esteira, após a lesão por esmagamento do nervo isquiático em camundongos. Para isto, camundongos Swiss e BALB/cJ selvagens (WT) e BALB/cJ *knockouts* para IL-4 (IL-4^{-/-}) machos foram submetidos à lesão do nervo isquiático, e, três dias após a lesão, foram submetidos a um programa de exercício físico de baixa intensidade na esteira (30 min/dia, velocidade de 10 m/min, 5 dias/semana), por duas semanas. O exercício físico apresentou importante efeito anti-hiperalgésico reduzindo os comportamentos relacionados à dor neuropática quando avaliados nos testes de von Frey, fuga/esquiva e campo aberto. Parte do efeito neurobiológico do exercício físico é dependente das células do sistema imunológico que migram para o nervo lesionado, pois, a analgesia produzida pelo exercício foi prevenida pela fucoidina (100 µg/animal, i.p.), a qual inibe a migração de leucócitos da circulação sanguínea para o local da lesão. Além disso, o exercício físico promoveu o aumento das concentrações das citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e IL-1ra, e das neurotrofinas BDNF e β-NGF, no nervo isquiático, e IL-4, IL-5 e IL-1ra na medula espinal, bem como, reduziu as concentrações do BDNF e β-NGF na medula espinal. O efeito anti-hiperalgésico do exercício físico observado em camundongos BALB/cJ WT foi reduzido em camundongos IL-4^{-/-}, confirmando o importante papel da IL-4 neste efeito. Ademais, foi demonstrado que a IL-4 pode modular o perfil fenotípico de macrófagos, pois, camundongos WT exercitados mostraram maior marcação para

macrófagos M2_{a/c}, enquanto os camundongos IL-4^{-/-} exercitados apresentaram maior marcação para macrófagos M1. Estes achados fornecem evidências de que o exercício físico promove a alteração fenotípica de macrófagos via liberação da IL-4, o que pode induzir uma resposta das células Th2 e reduzir a dor neuropática, a inflamação e auxiliar no processo de regeneração nervosa. Além disso, foi observado o aumento da expressão da PMP22 no nervo isquiático de animais exercitados, indicando maior concentração de mielina nos axônios em regeneração. O efeito anti-hiperalgésico do exercício físico foi dependente da redução da ativação de astrócitos e microglia na medula espinal. A analgesia causada pelo exercício físico também foi prevenida pelo PCPA (100 mg/kg i.p., um inibidor da síntese de serotonina [5-HT]), mas não pelo AMPT (100 mg/kg i.p., um inibidor da síntese de catecolaminas), sugerindo importante papel do sistema serotoninérgico no efeito do exercício. Ademais, o exercício físico promoveu aumento da concentração de 5-HT e seu metabólito, o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) no tronco encefálico, e este efeito foi prevenido pelo PCPA. O conteúdo de noradrenalina (NA) foi aumentado com o exercício físico, mas não o de dopamina (DA), e o PCPA também preveniu este aumento, demonstrando a interação entre os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico. No entanto, a expressão gênica das enzimas triptofano hidroxilase 2 (Tph2) e dopamina beta hidroxilase (Dbh) não foram alteradas após a lesão, nos animais submetidos ou não ao exercício físico. O exercício também foi capaz de aumentar a expressão gênica dos receptores 5-HT1_AR, 5-HT1_BR, 5-HT2_AR, 5-HT2_CR e 5-HT3_AR no tronco encefálico. Por fim, o exercício físico reduziu a densidade dos transportadores de serotonina (SERT) nos núcleos da rafe (RPa, RMg e Rob), os quais estavam aumentados após a lesão, sendo este efeito dependente da redução da IL-1 β e do TNF- α , no tronco encefálico. Em conjunto, estes resultados mostram o efeito terapêutico do exercício físico na redução da dor neuropática e regeneração nervosa, através de mecanismos que dependem da ativação do sistema neuroimunológico no local da lesão e na medula espinal, bem como a ativação do sistema endógeno descendente de controle da dor, em especial, da neurotransmissão serotoninérgica no tronco encefálico.

Palavras-chave: Exercício físico; dor neuropática; lesão do nervo isquiático; regeneração nervosa; células gliais; macrófagos; serotonina e interleucina-4.

ABSTRACT

Neuropathic pain which arises as a result of spinal nerve injury is characterized by an abnormal response of the pain transmission routes. In addition, changes generated by muscle denervation impair motor function, which together with neuropathic pain reduce the quality of life of these patients. Regular physical exercise can positively benefit physical and mental health, improving the quality of life and reducing the incidence of chronic diseases associated with sedentary lifestyle. Physical exercise is also effective in the rehabilitation of patients after spinal nerve injuries through support muscle properties and promotes functional recovery. However, despite the great clinical relevance, few studies have identified the beneficial effect of exercise on neuropathic pain and functional recovery, as well as its neurobiological mechanisms. The aim of this work was to study the anti-hyperalgesic and neuroregenerative effect of low-intensity exercise, performed on the treadmill, after the sciatic nerve crush injury in mice. Then, Swiss and BALB/cJ wild-types (WT) and BALB/cJ IL-4 knockouts (IL-4^{-/-}) males mice were subjected to sciatic nerve injury, after that, three days after injury, mice performed low-intensity exercise on the treadmill (30 min/day, speed of 10 m/min, 5 days/week), for two weeks. Physical exercise showed significant anti-hyperalgesic effect reducing neuropathic pain-related behaviors when assessed by von Frey, escape/avoidance and open field test. Part of the neurobiological effect of physical exercise is dependent on immune cells that migrate to the injured nerve, because the analgesia produced by exercise was prevented by fucoidin (100 µg/mouse, i.p.), that inhibits leukocytes migration from bloodstream to the site of injury. Furthermore, physical exercise promoted increasing concentrations of anti-inflammatory cytokines levels, IL-4 and IL-1ra, and neurotrophins BDNF and β-NGF, in the sciatic nerve, and IL-4, IL-5 and IL-1ra in the spinal cord, as well as it reduced β-NGF and BDNF levels in the spinal cord. The noted analgesic effect of physical exercise in BALB/cJ WT mice was reduced in IL-4^{-/-} mice, it confirming the important role of IL-4 on this effect. Furthermore, it was shown that IL-4 can modulate the phenotypic profile of macrophages, because WT exercised mice showed stronger staining for M2_{a/c} macrophages, while IL-4^{-/-} exercised mice presented marked staining for M1 macrophages. These findings provide evidence that physical exercise promotes the phenotypic switch of macrophages by release of IL-4, which can induce Th2 cells response and reducing

neuropathic pain, inflammation and helps nerve regeneration process. Furthermore, an increased PMP22 level in the sciatic nerve of exercised animals was observed, indicating higher concentration of myelin in regenerating axons. The anti-hyperalgesic effect of physical exercise was dependent on reduction of astrocytes and microglia activation in the spinal cord. The analgesia caused by physical exercise was also prevented by PCPA (100 mg/kg i.p., an inhibitor of serotonin [5-HT] synthesis), but not by AMPT (100 mg/kg i.p., an inhibitor of catecholamine synthesis), it suggesting the important role of the serotonergic system in the effect of exercise. Furthermore, physical exercise promotes increased 5-HT concentration and its metabolite, the 5-hydroxy-indoleacetic acid (5-HIAA) in the brainstem, and its effect was prevented by the PCPA. The noradrenaline (NA) content was increased by physical exercise, but not the dopamine (DA) content, and the PCPA also prevented this increase, demonstrates the interaction between serotonergic and noradrenergic systems. However, tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) and dopamine beta hydroxylase (Dbh) enzymes gene expression were not changed after injury, in the animals submitted or not to physical exercise. The exercise was also able of increasing 5-HT_{1A}R, 5-HT_{1B}R, 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2C}R e 5-HT_{3A}R receptors gene expression in the brainstem. Finally, physical exercise reduced serotonin transporter (SERT) density in the raphe nuclei (RPa, RMg and ROb), which were increased after injury, and this effect was dependent of IL-1 β and TNF- α reduced levels in the brainstem. Together, these results demonstrate the therapeutic effect of physical exercise on neuropathic pain reducing and nerve regeneration, through mechanisms that depending on the neuroimmune system activation at the site of injury and spinal cord, as well as the activation of endogenous descending pain control system, especially of serotonergic neurotransmission in the brainstem.

Keywords: Physical exercise; neuropathic pain; sciatic nerve injury; nerve regeneration; glial cells; macrophages; serotonin and interleukin-4.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1 - Figura esquemática das principais características da dor neuropática | 31 |
| Figura 2 - Eventos no processo de degeneração Walleriana distal..... | 41 |
| Figura 3 - Ativação Glial: do estado pró- ao anti-inflamatório | 47 |
| Figura 4 - Principal sistema modulatório ascendente e descendente da dor | 51 |
| Figura 5 - Componentes estruturais dos nervos espinais e modelo de lesão nervosa induzida pelo esmagamento do nervo..... | 53 |
| Figura 6 - Polarização de macrófagos para o fenótipo M1 ou M2 | 64 |
| Figura 7 - Representação esquemática e temporal do protocolo experimental da parte I..... | 73 |
| Figura 8 - Representação esquemática e temporal do protocolo experimental da parte II..... | 76 |
| Figura 9 - Indução da lesão por esmagamento do nervo isquiático em camundongos..... | 79 |
| Figura 10 - Esteiras utilizadas para a realização do exercício físico de corrida | 80 |
| Figura 11 - Efeito do exercício físico na hiperalgesia mecânica, processamento cortical da nocicepção e locomoção espontânea..... | 99 |
| Figura 12 - Papel da migração de leucócitos para o local da lesão no efeito do exercício físico | 101 |
| Figura 13 - Efeito do exercício físico nas concentrações das interleucinas IL-4, IL-5, IL-1ra e IL-6 no nervo isquiático..... | 103 |
| Figura 14 - Efeito do exercício físico na hiperalgesia mecânica em animais BALB/cJ WT e IL-4 ^{-/-} | 105 |
| Figura 15 A e B - Efeito do exercício físico e papel da IL-4 na migração e fenótipo de macrófagos presentes no nervo isquiático após a lesão. | 108 |
| Figura 15 C e D - Efeito do exercício físico e papel da IL-4 na migração e fenótipo de macrófagos presentes no nervo isquiático após a lesão. | 109 |
| Figura 16 - Efeito do exercício físico nas concentrações das neurotrofinas BDNF e β -NGF e da proteína da mielina PMP22 no nervo isquiático | 111 |
| Figura 17 - Degeneração Walleriana distal após a lesão por esmagamento do nervo isquiático de camundongos | 113 |
| Figura 18 - Efeito do exercício físico nas concentrações das interleucinas IL-4, IL-5, IL-1ra e IL-6 e das neurotrofinas BDNF e β -NGF na medula espinal..... | 115 |

| | |
|--|-----|
| Figura 19 - Efeito do exercício físico na reatividade de células gliais no corno dorsal da medula espinal e quantificação da imunomarcção de GFAP e Iba1 | 117 |
| Figura 20 - Papel do sistema serotoninérgico no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico | 120 |
| Figura 21 - Concentrações de 5-HT, do seu metabólito 5-HIAA e taxa de <i>turnover</i> de 5-HT após a lesão por esmagamento do nervo isquiático e o tratamento com exercício físico | 121 |
| Figura 22 - Efeito do exercício físico na imunomarcção dos SERT nos núcleos caudais da rafe bulbar | 123 |
| Figura 23 - Efeito do exercício físico na expressão gênica dos SERT no tronco encefálico | 125 |
| Figura 24 - Efeito do exercício físico nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no tronco encefálico..... | 126 |
| Figura 25 - Efeito do exercício físico na expressão gênica de receptores de 5-HT no tronco encefálico..... | 128 |
| Figura 26 - Papel do sistema catecolaminérgico no exercício físico após a lesão do nervo isquiático | 132 |
| Figura 27 - Efeito do exercício físico no conteúdo de DA e seus metabólitos no tronco encefálico e medula espinal..... | 134 |
| Figura 28 - Efeito do exercício físico sobre as interações neuroimunes e liberação de neurotrofinas no local da lesão no nervo | 148 |
| Figura 29 - Efeito do exercício físico na liberação de citocinas, neurotrofinas e ativação de células gliais na medula espinal | 153 |
| Figura 30 - Efeito do exercício físico de baixa intensidade sobre as sinapses serotoninérgicas do tronco encefálico..... | 161 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Sumário dos efeitos do exercício físico em modelos animais de lesão em nervos espinais | 60 |
| Tabela 2 – Genes para a análise por PCR quantitativo em tempo real e suas respectivas referências no NCBI, <i>primers</i> , tamanho do fragmento e referências | 89 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA – Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT – 5 hidroxitriptamina, serotonina
5-HT_{1A}R - Receptor de Serotonina 5-HT_{1A}
5-HT_{1B}R - Receptor de Serotonina 5-HT_{1B}
5-HT₁R – Receptor de Serotonina 5-HT₁
5-HT_{2A}R - Receptor de Serotonina 5-HT_{2A}
5-HT_{2C}R - Receptor de Serotonina 5-HT_{2C}
5-HT₂R - Receptor de Serotonina 5-HT₂
5-HT_{3A}R - Receptor de Serotonina 5-HT_{3A}
5-HT₃R - Receptor de Serotonina 5-HT₃
5-HT₄R - Receptor de Serotonina 5-HT₄
5-HT₅R - Receptor de Serotonina 5-HT₅
5-HT₆R - Receptor de Serotonina 5-HT₆
5-HT₇R - Receptor de Serotonina 5-HT₇
 α CD206 – Receptor de manose C, tipo 1
AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
AMPA - Receptor do α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
AMPT - α -metil-para-tirosina
ANOVA – Análise de variância
Arg – Arginase
ASIC – Canal iônico sensível a ácido
ATP – Trifosfato de adenosina
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BHN – Barreira hematoneural
BSA – Albumina de soro bovino
CCL2 - quimiocina C-C motif ligante 2
CCL3 - Quimiocina C-C motif ligante 3
CD11b - Cluster de diferenciação 11b
CD163 - Cluster de diferenciação 163
CD86 - Cluster de diferenciação 86
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-2 – Ciclo-oxigenase-2
CREB – Elemento de ligação responsivo ao AMP cíclico
CSF-1 - Fator estimulador de colônia-1
CSF1R - Receptor 1 do fator estimulador de colônia
CXCL1 - Quimiocina C-X-C motif ligante 1
CXCL2 - Quimiocina C-X-C motif ligante 2

CXCL3 - Quimiocina C-X-C motif ligante 3
DA - Dopamina
Dbh - Dopamina beta hidroxilase
DHPG - 3,5-hidroxifenilglicina
DNac - Ácido desoxirribonucleico complementar
DOPAC - Ácido di-hidroxifenilacético
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima
EPM - Erro padrão da média
GABA - Ácido gama-aminobutírico
GAP-43 - Proteína associada ao crescimento-43
GDNF - Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP - Proteína ácida fibrilar glial
GRD - gânglio da raiz dorsal
HPLC-ED - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico
HVA - Ácido homovanílico
i.p. - Intraperitoneal
IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor
Iba1 - Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1
IFN- γ - Interferon gama
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-10 - Interleucina-10
IL-13 - Interleucina-13
IL-18 - Interleucina-18
IL-1R - Receptor de interleucina 1
IL-1ra - Antagonista do receptor de interleucina-1
IL-1 β - Interleucina-1 beta
IL-34 - Interleucina-34
IL-4 - Interleucina-4
IL-4R-I - Receptor tipo I de interleucina-4
IL-4R-II - Receptor tipo II de interleucina-4
IL-5 - Interleucina-5
IL-6 - Interleucina-6
IL-6R - Receptor de IL-6
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida
INSS - Instituto Nacional do Seguro Social
ISRS - Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LIF - Fator inibitório da leucemia
LPS - Lipopolissacarídeos
MAG - Glicoproteína associada à mielina

MAO – Monoamina oxidase
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1
MEC – Matriz extracelular
MHC II - Complexo principal de histocompatibilidade II
MMP2 – metaloproteinases matriz 2
MMP9 - metaloproteinases matriz 9
NA – Noradrenalina
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
NGF - Fator de crescimento do nervo
NGS - *Normal Goat Serum*
NIH – National Institutes of Health
NK-1 - Neurocinina-1
NMDA - N-metil D-Aspartato
NMDAR – Receptor N-metil D-Aspartato
NO – óxido nítrico
NT-3 – Neurotrofina-3
NT-4 – Neurotrofina-4
OCT - *Optimal Cutting Temperature compound*
P0 - Proteína zero
p75^{NTR} - Receptor de neurotrofinas p75
PAG – Substância cinzenta periaquedutal
PBS – Solução tampão fosfato
PCPA - ρ -clorofenilalanina metil éster
PCRq – PCR quantitativo
PFA - Paraformaldeído
PGC-1 α/β - Coativador 1 α/β de PPAR γ
PGs – Prostaglandinas
PKC – Proteína cinase C
PKG - Proteína cinase G
PMP22 - Proteína da mielina periférica 22
PMSF - Fenilmetilsulfonilfluoreto
POMC - Pró-opiomelanocortina
PPAR γ - Receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma- γ
RMg - Núcleo magno da rafe
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
ROb – Núcleo obscuro da rafe
RPa - Núcleo pálido da rafe
RVM – Bulbo rostroventromedial
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SERT - Transportadores de serotonina

SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
SP - Substância P
STAT6 - Sinal transdutor e ativador de transcrição 6
TBS-T - Tampão Salina Tris com Tween® 20
TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta
Th – Enzima tirosina hidroxilase
Th1 – Células T helper 1
Th2 – Células T helper 2
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α
Tph2 – Triptofano hidroxilase 2
TrK - Receptor de tropomiosina cinase
TRPM8 - Receptor de potencial transitório melastatina 8
TRPV1 - Receptor de potencial transitório vanilóide 1
TRPV1 - Receptor de potencial transitório vanilóide 2
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
WT – Wild type

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 29 |
| 1.1 | DOR CRÔNICA..... | 29 |
| 1.2 | DOR NEUROPÁTICA | 30 |
| 1.3 | EVENTOS NO PROCESSO DE DEGENERAÇÃO WALLERIANA | 33 |
| 1.3.1 | Proliferação e diferenciação de células de Schwann..... | 33 |
| 1.3.2 | Reações do sistema imunológico | 35 |
| 1.3.2.1 | Infiltração de mastócitos | 35 |
| 1.3.2.2 | Infiltração de neutrófilos | 35 |
| 1.3.2.3 | Recrutamento de linfócitos | 36 |
| 1.3.2.4 | Recrutamento de macrófagos | 36 |
| 1.3.2.5 | Subtipos específicos de macrófagos recrutados após a lesão do nervo | 37 |
| 1.3.3 | Interações neuroimunes após a lesão do nervo | 39 |
| 1.4 | PAPEL DOS ASTRÓCITOS E DA MICROGLIA NA DOR NEUROPÁTICA..... | 42 |
| 1.5 | MECANISMOS ENDÓGENOS DE CONTROLE DA DOR ... | 48 |
| 1.6 | MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA E REGENERAÇÃO NERVOSA | 52 |
| 1.7 | EXERCÍCIO FÍSICO | 54 |
| 1.8 | EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA REGENERAÇÃO E NA PLASTICIDADE APÓS A LESÃO DE NERVOS ESPINAIS..... | 54 |
| 1.9 | EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DOR NEUROPÁTICA | 57 |
| 1.10 | PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NO SISTEMA IMUNOLÓGICO | 63 |
| 1.11 | HIPÓTESE..... | 65 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 67 |
| 3 | OBJETIVOS | 69 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 69 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 69 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 4.1 | PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS | 71 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.1.1 | Parte I – Papel das interações neuroimunes no efeito anti-hiperalgésico e neuroregenerativo do exercício físico após a lesão do nervo isquiático | 71 |
| 4.1.2 | Parte II - Papel das monoaminas no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico após a lesão do nervo isquiático | 74 |
| 4.2 | ANIMAIS..... | 77 |
| 4.3 | LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO . | 78 |
| 4.4 | PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO DE BAIXA INTENSIDADE..... | 79 |
| 4.5 | TESTES COMPORTAMENTAIS..... | 81 |
| 4.5.1 | Teste de von Frey | 81 |
| 4.5.2 | Teste do paradigma fuga/esquiva..... | 81 |
| 4.5.3 | Teste do campo aberto | 82 |
| 4.6 | ENSAIOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> | 82 |
| 4.6.1 | Participação de leucócitos no efeito do exercício físico..... | 82 |
| 4.6.2 | Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do exercício físico..... | 83 |
| 4.6.3 | Envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito do exercício físico..... | 83 |
| 4.7 | ENSAIOS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E IMUNOLÓGICOS..... | 84 |
| 4.7.1 | Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima | 84 |
| 4.7.2 | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico | 85 |
| 4.7.3 | Western Blotting | 86 |
| 4.7.4 | PCR Quantitativo em Tempo Real | 87 |
| 4.8 | ENSAIOS DE IMUNOISTOQUÍMICA..... | 91 |
| 4.8.1 | Imunofluorescência de macrófagos no nervo isquiático | 91 |
| 4.8.2 | Imunofluorescência dos SERT nos núcleos caudais da rafe bulbar | 92 |
| 4.8.3 | Imunofluorescência de astrócitos e microglia na medula espinal | 93 |
| 4.8.4 | Microscopia confocal, captura e análise das imagens | 93 |
| 4.9 | ANÁLISE HISTOLÓGICA..... | 94 |
| 4.9.1 | Microscopia eletrônica | 95 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.10 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 96 |
| 5 | RESULTADOS | 97 |
| 5.1 | PARTE I - PAPEL DAS INTERAÇÕES NEUROIMUNES NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO E NEUROREGENERATIVO DO EXERCÍCIO FÍSICO APÓS A LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO.. | 97 |
| 5.1.1 | Efeito do exercício físico na hiperalgesia mecânica, no processamento cortical da nocicepção e na locomoção espontânea | 97 |
| 5.1.2 | Papel da migração dos leucócitos para o local da lesão no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico | 100 |
| 5.1.3 | Efeito do exercício físico nas concentrações das interleucinas IL-4, IL-5, IL-1ra e IL-6 no nervo isquiático | 102 |
| 5.1.4 | Efeito do exercício físico na hiperalgesia mecânica em animais BALB/cJ WT e IL-4 ^{-/-} | 104 |
| 5.1.5 | Efeito do exercício físico e papel da IL-4 na migração e no fenótipo de macrófagos presentes no nervo isquiático após a lesão | 106 |
| 5.1.6 | Efeito do exercício físico nas concentrações das neurotrofinas BDNF e β -NGF e da proteína da mielina PMP22 no nervo isquiático..... | 110 |
| 5.1.7 | Degeneração Walleriana distal após a lesão por esmagamento do nervo isquiático de camundongos..... | 112 |
| 5.1.8 | Efeito do exercício físico nas concentrações das interleucinas IL-4, IL-5, IL-1ra e IL-6 e das neurotrofinas BDNF e β -NGF na medula espinal | 114 |
| 5.1.9 | Efeito do exercício físico na reatividade de células gliais no corno dorsal da medula espinal..... | 116 |
| 5.2 | PARTE II - PAPEL DAS MONOAMINAS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DO EXERCÍCIO FÍSICO APÓS A LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO | 118 |
| 5.2.1 | Papel do sistema serotoninérgico no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico..... | 118 |
| 5.2.2 | Efeito do exercício físico na imunomarcação dos SERT nos núcleos caudais da rafe bulbar..... | 122 |
| 5.2.3 | Efeito do exercício físico na expressão gênica dos SERT no tronco encefálico..... | 124 |
| 5.2.4 | Efeito do exercício físico nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no tronco encefálico..... | 125 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 5.2.5 | Efeito do exercício físico na expressão gênica de receptores de 5-HT no tronco encefálico | 127 |
| 5.2.6 | Papel do sistema catecolaminérgico no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico | 129 |
| 6 | DISCUSSÃO | 135 |
| 6.1 | PARTE I – PAPEL DAS INTERAÇÕES NEUROIMUNES NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO E NEUROREGENERATIVO DO EXERCÍCIO FÍSICO APÓS A LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO..... | 135 |
| 6.1.1 | Efeito anti-hiperalgésico do exercício físico..... | 136 |
| 6.1.2 | Efeito do exercício físico nas interações neuroimunes..... | 139 |
| 6.1.3 | Efeito do exercício físico na liberação de neurotrofinas.... | 145 |
| 6.1.3.1 | No local da lesão no nervo..... | 145 |
| 6.1.3.2 | Na medula espinal..... | 147 |
| 6.1.4 | Efeito do exercício físico na liberação de citocinas anti-inflamatórias e ativação de células gliais | 150 |
| 6.2 | PARTE II - PAPEL DAS MONOAMINAS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DO EXERCÍCIO FÍSICO APÓS A LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO | 154 |
| 6.2.1 | Efeito proeminente do exercício físico na neurotransmissão serotoninérgica do tronco encefálico | 155 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 162 |
| | REFERÊNCIAS | 163 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR CRÔNICA

De uma maneira geral, a sensação de dor é um mecanismo de alerta do organismo saudável, a qual indica a presença de um estímulo nocivo e que aciona respostas protetoras apropriadas (WOOLF, SALTER, 2000; JULIUS, BASBAUM, 2001). Ao contrário dos sentidos como visão e audição, que dependem da ativação de áreas agrupadas do encéfalo, a sensação de dor acontece através da comunicação entre uma rede de neurônios complexa e adaptativa, que envolve várias áreas encefálicas de uma maneira multidimensional, como descrita na teoria da neuromatriz de Ronald Melzack (MELZACK, 2001). A dor é uma das funções mais importantes da evolução, dessa maneira, o funcionamento adequado do sistema nociceptivo é essencial para proteger o organismo de danos teciduais.

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês: *International Association for the Study of Pain*, IASP), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008). Esta definição enfatiza que a dor é uma experiência complexa que inclui a cognição, a sensação e a emoção em sua percepção (MELZACK, 2001; JULIUS; BASBAUM, 2001). Entretanto, em condições patológicas, este sistema pode se tornar sensibilizado e a dor transforma-se em uma doença (ZEILHOFER, 2005).

Estudos populacionais apontam que a prevalência global da dor crônica é estimada entre 20% e 40% (LEE; TRACEY 2010; RAFTERY et al., 2011; TOBLIN et al., 2011; WONG; FIELDING 2011; LANDMARK et al., 2012), podendo ser ainda maior, chegando a 64%, como relatado por Watkins et al. (2008). Infelizmente, cerca de 50% desses indivíduos ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, o que interfere de modo significativo tanto na qualidade de vida como na capacidade produtiva desta população (INSTITUTE OF MEDICINE COMMITTEE ON ADVANCING PAIN RESEARCH AND EDUCATION, 2011).

No Brasil a prevalência de dor crônica é ainda maior; aproximadamente 75% dos pacientes que procuram os serviços públicos de saúde relatam a presença deste sintoma (HOLTZ; STECHMAN NETO, 2008). Além disso, verificou-se que 94,9% dos pacientes com

dor crônica apresentam comprometimento da atividade profissional (KRELING et al., 2006). Dados do Instituto Nacional do Seguro Social (INSS) apontam que 20% dos benefícios concedidos por afastamento do trabalho são destinados a pacientes com dores crônicas (DATAPREV, 2014), tornando-a um problema de saúde pública, com um impacto socioeconômico importante.

Apesar da elevada prevalência e do impacto negativo da dor crônica na qualidade de vida do paciente, seu tratamento médico tem sido negligenciado por muitas razões. Numerosos estudos mostraram que o manejo clínico de várias condições de dor crônica permanece insatisfatório. Isto está refletido na observação de que uma redução de 50% ou mais da dor somente é atingida em cerca de 30% a 40% dos pacientes (BACKONJA; IRVING; ARGOFF, 2006; DOBKIN; BOOTHROYD, 2008; FINNERUP; SINDRUP; JENSEN, 2010). A tendência é preocupar-se com a dor crônica como sendo apenas um sintoma e geralmente tornar o seu tratamento paliativo, quando na verdade, ela é a própria doença. Desta maneira, está claro que melhorar o tratamento para esta condição deve ser uma importante prioridade da área da saúde.

1.2 DOR NEUROPÁTICA

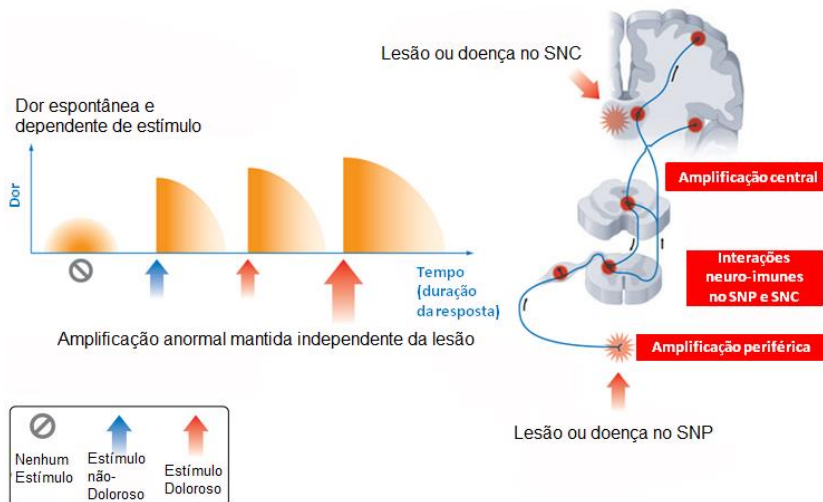
A dor neuropática é um tipo específico de dor crônica causada por lesão ou doença do sistema somatosensorial, podendo ser de origem central ou periférica (LOESER; TREEDE, 2008). Esta condição pode resultar de uma gama de doenças e disfunções que incluem trauma, inflamação, doenças metabólicas (por exemplo, diabetes), infecções (por exemplo, herpes zoster), tumores e doenças neurológicas primárias (BOUHASSIRA et al., 2008).

Estatísticas indicam que a dor neuropática é relativamente comum, com uma prevalência estimada na população mundial em torno de 1% a 7% (DWORKIN et al., 2003; IRVING, 2005; BOUHASSIRA et al., 2008), sendo que uma em cada três pessoas acometidas é incapaz de manter-se independente na execução das tarefas de vida diárias devido à sua condição (SINISCALCO; ROSSI; MAIONE, 2007). Como consequência, a dor neuropática promove um decréscimo importante na qualidade de vida dos indivíduos e também a gastos excessivos do sistema público de saúde com o tratamento destas disfunções. Nos Estados Unidos, é estimado que o custo anual do tratamento da dor neuropática periférica pós-traumática ou pós-cirúrgica é de,

aproximadamente, 5 mil dólares por paciente, sendo que os custos indiretos ao tratamento podem alcançar até, aproximadamente, 27 mil dólares anuais (SCHAEFER et al., 2014).

A dor neuropática pode ser espontânea e continuar sem a estimulação externa, sendo muitas vezes sentida como queimação, formigamento ou dor em pontadas. Ela também pode ser evocada por estímulos inócuos (alodinia) e, nesse caso, até mesmo vestir roupas ou tocar em superfícies frias pode gerar uma sensação de dor. A dor neuropática também pode gerar hiperalgesia, quando a exposição a estímulos nocivos resulta em uma sensação de dor mais forte do que antes da lesão (JI; WEN, 2006). Estes sintomas surgem como resultado da sensibilização periférica e central, que se caracterizam por mudanças plásticas que modificam o desempenho da via nociceptiva, aumentando e prolongando a resposta aos estímulos periféricos (Figura 1) (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Além disso, a dor neuropática pode persistir por muito tempo após cessar a sua causa inicial e, portanto, torna-se uma doença em vez de um sintoma, impactando acentuadamente o bem-estar do paciente.

Figura 1 - Figura esquemática das principais características da dor neuropática



Legenda: Figura esquemática das principais características da dor neuropática.

Fonte: Adaptado de Costigan, Scholz e Woolf (2009).

Neste trabalho, utilizamos um modelo experimental de dor neuropática gerada pelo esmagamento do nervo isquiático em camundongos. Em humanos, lesões traumáticas de nervos espinais são relativamente comuns e estima-se que a incidência anual global seja de, aproximadamente, 500 mil casos. Estas lesões podem causar um severo prejuízo funcional, levando à dor crônica neuropática, além da diminuição da qualidade de vida pela perda parcial ou total das funções sensoriais, motoras e autonômicas do segmento corporal acometido (VALERO-CABRÉ, 2004). Uma variedade de fenômenos, tanto periféricos quanto centrais, está relacionada às lesões em nervos espinais (MACHELSKA, 2011). Estes fenômenos serão evidenciados nos itens 1.3 e 1.4.

Um dos principais mecanismos responsáveis pela dor neuropática é a geração de potenciais de ação ectópicos em múltiplos locais das vias nociceptivas, incluindo o neuroma, o corpo celular no gânglio da raiz dorsal (GRD), bem como os neurônios aferentes vizinhos não lesionados. Além disso, a nociceção, normalmente transmitida por nociceptores de fibras C e fibras A δ , pode passar a ser transmitida até mesmo por fibras A β , que normalmente sinalizam sensações inócuas, o que é causado pelo brotamento colateral de neurônios aferentes primários (CAMPBELL et al., 1988). As fibras A β são classificadas como de grande diâmetro, mielinizadas e fazem sinapses em lâminas mais profundas do corno dorsal da medula espinal (lâmina III-V), enquanto as fibras A δ de diâmetro intermediário, pouco mielinizadas e os nociceptores de fibras C de pequeno diâmetro, não mielinizadas fazem sinapses em lâminas mais superficiais (I e II). Acredita-se que, após a lesão em nervos espinais, as fibras A β emitam brotamentos colaterais para lâminas mais superficiais (II), ampliando o campo receptivo do neurônio e facilitando a interpretação de estímulos mecânicos periféricos inócuos como agressivos. Isso explica, pelo menos em parte, a alodinia mecânica que acontece após lesões em nervos espinais (KOHAMA; ISHIKAWA; KOCSIS, 2000).

De modo adicional, os mediadores inflamatórios ativam vias de sinalização intracelular no terminal do nociceptor, promovendo aumento na produção, transporte e inserção na membrana de canais transdutores e canais iônicos dependentes de voltagem, tais como receptores de potencial transitório vanilóide 1 e 2 (TRPV1 e TRPV2), receptor de potencial transitório melastatina 8 (TRPM8), canal iônico sensível a ácido (ASIC) e canais de sódio resistentes a tetrodotoxina, Nav 1.8 e 1.9, que aumentam as correntes de sódio e cálcio, contribuindo para a geração de potenciais ectópicos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Todas essas alterações pré-sinápticas promovem mudanças na medula espinal e no encéfalo, que são referidas como sensibilização central (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). O glutamato, liberado excessivamente na medula espinal, bem como a interação neurônio-glia por meio da liberação de citocinas quimiotáticas e outros moduladores, promovem a ativação de células gliais (microglia e astrócitos). Uma vez que estas células se tornam ativadas, elas contribuem para o desenvolvimento e manutenção da sensibilização central (WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001). Além disso, vias centrais do tronco encefálico envolvendo projeções da substância cinzenta periaquedutal (PAG) para o bulbo rostroventromedial (RVM) e núcleos noradrenérgicos A₆/A₇ na ponte, os quais se projetam para o corno dorsal da medula espinal, podem desempenhar um papel crítico tanto na inibição quanto na facilitação descendente da dor neuropática (PORRECA; OSSIPOV, GEBHART 2002; MA; EISENACH, 2003).

Além de todas essas mudanças neurobiológicas descritas anteriormente, a dor crônica, incluindo a dor neuropática, também é influenciada por fatores cognitivos (memória, expectativa), emocionais (ansiedade, depressão) e ambientais (reforço, condicionamento). Muitos pacientes com dor crônica de origem neuropática desenvolvem depressão, ansiedade, raiva, dificuldade de locomoção e falta de motivação. Além da dor e dos processos somáticos, muitas vezes estes pacientes enfrentam conflitos familiares, com a previdência social e com o sistema de saúde, os quais dificultam o retorno ao trabalho e levam ao afastamento social. Esse conceito biopsicossocial da dor crônica promove uma base para a sua gestão interdisciplinar, que inclui terapia psicológica, física e ocupacional, combinada com o tratamento farmacológico (MACHELSKA, 2011).

1.3 EVENTOS NO PROCESSO DE DEGENERAÇÃO WALLERIANA

1.3.1 Proliferação e diferenciação de células de Schwann

As células de Schwann, tendo perdido o contato axonal após uma lesão, são capazes de isolar pequenos espirais de mielina e gerar gotículas lipídicas, iniciando a degeneração e fagocitose da sua própria bainha de mielina, antes da chegada dos macrófagos. Este é o primeiro

passo na remoção dos *debris* celulares (STOLL et al., 1989; BRÜCK, 1997).

Simultaneamente a degeneração axonal, as células de Schwann quiescentes proliferaram e se diferenciam, alinhando-se ao redor da lâmina basal dos neurônios, formando assim, as chamadas bandas de Büngner, as quais mantêm a orientação original das fibras axonais, rearranjando-as como antes da lesão (ZOCHODNE, 2008). Este evento é muito importante para promover a regeneração axonal, pois estas células rapidamente alteram o seu fenótipo e diminuem a síntese de proteínas da mielina (por exemplo, proteína zero [P0], proteína da mielina periférica 22 [PMP22] e proteína básica da mielina [MBP]) e aumentam a regulação de genes associados à regeneração (por exemplo, fatores de crescimento, neurotrofinas, citocinas e moléculas de adesão) que promovem a regeneração axonal (ARAKI et al. 2001). A rápida remoção da mielina parece ser a condição mais importante para a regeneração axonal após a lesão do sistema nervoso periférico (SNP), devido à presença de inibidores de crescimento axonal na mielina e células de Schwann mielinizadas (SCHAFER et al., 1996; BARRETTE et al, 2008).

As células de Schwann imaturas do coto distal do nervo lesionado são a principal fonte de neurotrofinas e moléculas de adesão celular. Estas células regulam positivamente a síntese de fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e neurotrofina-4 (NT-4) (FUNAKOSHI et al., 1993). As neurotrofinas são capazes de promover o crescimento axonal a partir do coto proximal do nervo, tanto individualmente como em sinergismo (CAO; SHOICHET, 2003; GORDON, 2010;). No entanto, foi demonstrado que neurotrofinas como o NGF e o BDNF são importantes moduladores da dor neuropática e participam dos processos de sensibilização periférica e central após lesões de nervos espinais (PEZET; MCMAHON, 2006).

Além de neurotrofinas e moléculas de adesão, células de Schwann imaturas também representam a principal fonte de citocinas e quimiocinas que estimulam o recrutamento de macrófagos do sangue. A degradação final dos resíduos axonais e fragmentos de mielina pelas células fagocitárias que migram é importante para facilitar o brotamento e a regeneração axonal no coto distal à lesão (HIRATA; KAWABUCHI, 2002).

1.3.2 Reações do sistema imunológico

O sistema imunológico é essencial para a manutenção da homeostase dos tecidos e para a resposta às infecções e lesões; neste sentido, a resposta inflamatória envolve um delicado equilíbrio entre a imunidade inata e adaptativa. Estímulos inflamatórios podem induzir efeitos benéficos, tais como a fagocitose de detritos e células apoptóticas, além de iniciar os processos de reparo celular. Por outro lado, a inflamação não controlada pode resultar em produção de fatores neurotóxicos que exacerbam a patologia inicial (MOALEM; TRACEY, 2006).

Lesões em nervos espinais direcionam a infiltração e a ativação de células do sistema imunológico não somente para o local da lesão, mas também para o GDR e medula espinal. Além disso, a reação do sistema imunológico após a lesão de nervos espinais ilustra a extensão da reação neuroinflamatória das fibras em processo de degeneração Walleriana para outros compartimentos do sistema nervoso (MOALEM; TRACEY, 2006; THACKER et al., 2007; PINEAU; LACROIX, 2009)..

1.3.2.1 Infiltração de mastócitos

Os mastócitos se acumulam e degranulam dentro do endoneuro de nervos lesionados (ZUO et al, 2003; MONK et al, 2007). Mediadores, como a histamina e quimiocinas, são liberados por mastócitos dentro de horas após a lesão do nervo, e contribuem para o recrutamento de neutrófilos e monócitos/macrófagos, a iniciação da reação inflamatória e o desenvolvimento de hiperalgesia (ZUO et al, 2003; MOALEM; TRACEY, 2006). Os mastócitos também são capazes de liberar NGF e NT-4 (SKAPER et al., 2001), no entanto, não se conhece o envolvimento destas células na regeneração nervosa.

1.3.2.2 Infiltração de neutrófilos

Os neutrófilos são células essenciais no sistema imunológico inato e geralmente estão implicadas na patogênese da lesão tecidual e reação inflamatória, liberando uma gama de fatores inflamatórios (por exemplo, citocinas, quimiocinas e proteases) (MOALEM; TRACEY, 2006). O recrutamento de leucócitos para dentro do nervo lesionado ocorre como em outros tecidos e envolve o rolamento ao longo do

endotélio vascular mediado por selectinas (por exemplo, selectinas P e L), a adesão na superfície do endotélio mediado pelas integrinas (por exemplo, integrinas $\alpha 1\text{-}\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$) e a diapedese, que é a passagem destas células, do endotélio para o tecido lesionado. A migração de neutrófilos para o nervo lesionado parece ser induzida por mastócitos (MOALEM; TRACEY, 2006) e moléculas quimioatrativas, tais como citocinas (por exemplo, a interleucina (IL)- 1β e o fator de necrose tumoral- α [TNF- α]) (CASALE; CAROLAN, 1999a, b). Os neutrófilos invadem o endoneuro distal à lesão do nervo isquiático nos primeiros sete dias e contribuem para os mecanismos periféricos da dor neuropática (PERKINS; TRACEY, 2000).

1.3.2.3 Recrutamento de linfócitos

Os linfócitos também infiltram o endoneuro de nervos lesionados traumaticamente em vários modelos animais de dor neuropática (CUI et al., 2000; MOALEM et al., 2004). Além disso, tem sido observada a infiltração de linfócitos após a neurite experimental, que induz a dor neuropática sem uma lesão aparente na estrutura do axônio e de células gliais (ELIAV et al., 1999).

1.3.2.4 Recrutamento de macrófagos

Um considerável número de macrófagos reside dentro do endoneuro de nervos espinais. Os macrófagos endoneurais residentes são células alongadas com pequenas ramificações (MONACO et al., 1992; GRIFFIN; GEORGE; HO, 1993). Precocemente, dentro de 2 a 3 dias após a lesão do nervo isquiático por esmagamento e antes do robusto influxo de macrófagos hematogênicos, macrófagos endoneurais residentes são submetidos a sinais de ativação morfológica e imunofenotípica. Macrófagos hematogênicos infiltram o epineuro no local da lesão no terceiro dia e o espaço endoneural no quinto e sétimo dia após a lesão (TASKINEN; ROYTTA, 1997), então, se espalham por todo o coto distal do nervo lesionado e alcançam seu número máximo em 14 dias (MUELLER et al., 2003; OMURA et al., 2005a). O recrutamento de macrófagos promove uma rápida remoção dos *debris* de mielina, que por sua vez, contém inibidores do crescimento axonal, deste modo, promovem a facilitação da regeneração do nervo. Além disso, macrófagos não somente removem *debris* de mielina e axônio,

mas também participam da produção de fatores mitogênicos para fibroblastos e células de Schwann (PERRY; BROWN, 1992) e induzem a síntese de NGF através da liberação de IL-1 β (LINDHOLM et al, 1987).

É importante que as células de Schwann e macrófagos realizem cooperativamente a fagocitose da mielina, embora o mecanismo molecular da fagocitose da mielina pelas células de Schwann e macrófagos seja diferente. O primeiro passo da fagocitose pelas células de Schwann é mediado por uma lectina, enquanto que em macrófagos é dependente de opsonina (HIRATA; KAWABUCHI, 2002). O número máximo de macrófagos e o pico da atividade fagocítica acontecem em duas semanas após a lesão, passado este período, declina para os níveis normais (MUELLER et al., 2003; TASKINEN; ROYTTA, 1997), sendo eliminados por apoptose e levados pela circulação local aos linfonodos regionais (KUHLMANN et al., 2001). A invasão de macrófagos hematogênicos ocorre através da quebra da barreira hematoneural (BHN) no coto distal do nervo lesionado. Quando o processo de restauração desta barreira inicia-se, é seguido pela regeneração axonal, que ocorre no sentido proximal-distal (LIU et al., 2008).

Ao contrário do que foi observado por Mueller (2003) e Taskinen e Roytta (1997), Omura e colaboradores (2005) observaram que o número de macrófagos positivos para ED-1 (anticorpo anti-macrófagos/monócitos) não retorna aos níveis basais, mesmo após 56 dias decorridos da lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos. Eles concluíram que uma lesão por esmagamento, onde ocorre uma rápida iniciação do processo de regeneração axonal, resulta em precoce restauração da BHN, portanto, prevenindo a eliminação sistêmica de macrófagos via circulação pelos linfonodos locais (OMURA et al., 2005a). Desde que, macrófagos ativados secretam uma ampla gama de citocinas e induzem à expressão de neurotrofinas, os que permanecem dentro do segmento do nervo regenerado por um longo período, poderiam desempenhar um papel não somente na promoção da regeneração axonal, mas também na modulação da atividade do axônio regenerado (LESKOVAR et al., 2000; LEY; WEIGERT; BRUNE, 2010; MENDELL, ALBERS; DAVIS, 1999).

1.3.2.5 Subtipos específicos de macrófagos recrutados após a lesão do nervo

Como citado anteriormente, os macrófagos recrutados para o local da lesão podem ser classificados dentro de dois subgrupos, com fenótipos moleculares e funções efetoras distintas: “classicamente ativados” e “alternativamente ativados”, M1 e M2, respectivamente, os quais são funcionalmente polarizados em resposta a estímulos distintos. Os macrófagos M1 são induzidos por interferon- γ (IFN- γ) em conjunto com lipopolissacarídeos (LPS) ou TNF- α . Estas células produzem altas concentrações de intermediários tóxicos (por ex. óxido nítrico [NO] e espécies reativas de oxigênio) e citocinas pró-inflamatórias, as quais são essenciais para a sua habilidade em eliminar micróbios intracelulares e células tumorais, mas simultaneamente causam danos ao tecido do hospedeiro (BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). Por outro lado, os macrófagos M2, são subdivididos em três classes: M2_a, induzido por IL-4 ou IL-13; M2_b, induzido pela exposição à imunocomplexos, agonistas de receptores Toll-Like ou receptor de IL-1 (IL-1R); e M2_c, induzido pela IL-10 e por glicocorticoides. Os macrófagos M2_a promovem a cicatrização de lesões e o remodelamento do tecido, induzindo a resposta anti-inflamatória, a proliferação e migração celular, a liberação de fatores de crescimento, a remielinização e regeneração de axônios e a remoção de células apoptóticas. Os macrófagos M2_b tem um papel imunorregulatório, promovendo a maturação celular, a estabilização do tecido, a angiogênese, a síntese de matriz extracelular (MEC) e a regeneração axonal. Por fim, os macrófagos M2_c tem um papel imunossupressor, promovendo resolução da inflamação, reparo do tecido, síntese de MEC e fatores de crescimento (MANTOVANI et al., 2004).

Os macrófagos classificados dentro dos subgrupos M1 e M2 são funcionalmente ativados em resposta a estímulos distintos e caracterizados pela expressão funcional de marcadores de ativação celular (MANTOVANI et al., 2004). Como mencionado anteriormente, macrófagos M1 são caracterizados por aumento da expressão de NO sintase induzida (iNOS) e pela produção de NO. Deste modo, os macrófagos M1 são considerados inflamatórios e microbicidas. Do contrário, a produção de NO é inibida pela via da arginase (Arg) em macrófagos M2_a e M2_c, resultando em suas propriedades anti-inflamatória e pouco microbicida (RUTSCHMAN et al., 2001).

Um estudo avaliou o recrutamento de subtipos específicos de macrófagos, após a ligadura parcial do nervo isquiático de camundongos e demonstrou que a maioria dos macrófagos que infiltraram o local da lesão no nervo foram do subtipo M1, marcados com iNOS⁺/Arg-1⁻. Entretanto, quase todos os macrófagos que infiltraram o GRD foram do

tipo M2, iNOS⁻/Arg-1⁺. Deste modo, macrófagos que infiltram o nervo isquiático lesionado e o GRD parecem ter papéis distintos, por exemplo, inflamatório e anti-inflamatório, respectivamente. Além disso, a infiltração de macrófagos precede a ativação da microglia no corno dorsal da medula espinal, ipsilateral à lesão (KOMORI et al., 2011).

De fato, os macrófagos do subtipo M2 contribuem para a sobrevivência neuronal e o reparo do tecido (KIGERL et al., 2009). Komori et al. (2011) demonstraram que macrófagos M2_a e M2_c foram significativamente aumentados no lado ipsilateral do GRD, sem o acompanhamento da infiltração de macrófagos M1. Estes dados sugerem que após lesões de nervos espinais, a infiltração de macrófagos pode desempenhar diferentes papéis no desenvolvimento da dor neuropática, dependendo do local de infiltração e do fenótipo específico destas células.

Resumidamente, embora mais pesquisas sejam necessárias para esclarecer este tema, existem muitas evidências de que subpopulações distintas de macrófagos podem migrar da corrente sanguínea para os tecidos sob diferentes circunstâncias (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007), ou em resposta a estímulos diferentes (PORCHERAY et al., 2005). Por exemplo, estímulos microbianos, tais como LPS e citocinas derivadas de células T helper 1 (Th1), como IFN- γ e IL-1 β guiam a diferenciação em direção à via “clássica”, com macrófagos de fenótipo pró-inflamatório M1, que secretam citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6. Por outro lado, citocinas derivadas de células T helper 2 (Th2), como IL-4, IL-10 ou IL-13 induzem a diferenciação para a via “alternativa” de macrófagos M2, os quais geram mediadores anti-inflamatórios, tais como IL-10, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e IL-1ra (antagonista do receptor de IL-1) (GORDON, 2007; MANTOVANI et al., 2004; MOKARRAM et al., 2012).

1.3.3 Interações neuroimunes após a lesão do nervo

As interações neuroimunes são importantes mecanismos na sensibilização dos nociceptores periféricos, promovendo à sensibilização central após a lesão. No processo de degeneração Walleriana distal, quando as células de Schwann perdem o contato axonal, elas aumentam a produção de citocinas e quimiocinas que desempenham um papel na quimiotaxia de macrófagos hematogênicos. Atualmente é descrito que, o TNF- α e a IL-1 β desempenham um papel crucial na iniciação do processo degenerativo após a lesão no nervo

periférico, incluindo o recrutamento de macrófagos (GILLEN; JANDER; STOLL, 1998; LIEFNER et al., 2000). Além de macrófagos, também são recrutados para o local da lesão neutrófilos, mastócitos, e fibroblastos. Estas células liberam trifosfato de adenosina (ATP), prostaglandinas (PGs), NGF, TNF- α , IL-1 β e IL-6. Estes mediadores inflamatórios interagem com o neurônio lesionado e outras fibras não lesionadas, diminuindo o seu limiar de ativação e facilitando a transmissão da informação nociceptiva (Figura 2) (JULIUS; BASBAUM, 2001).

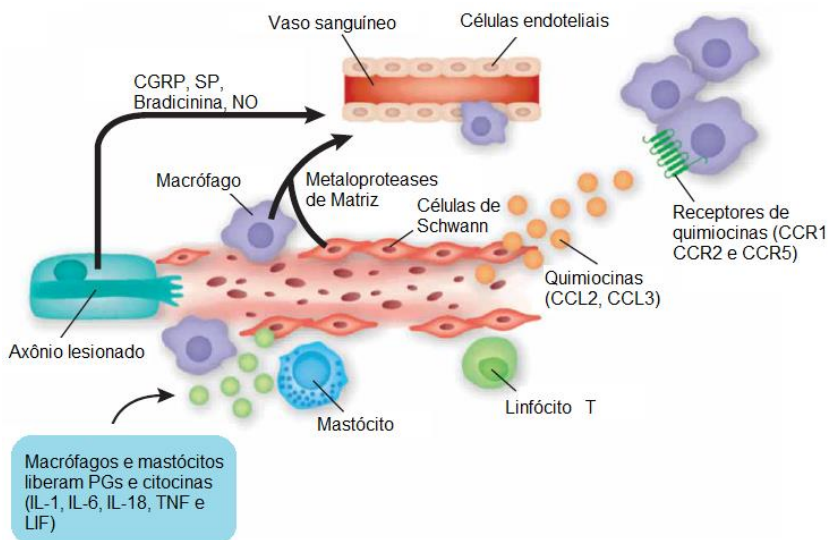
Simultaneamente, outras citocinas e quimiocinas podem ser implicadas no recrutamento de macrófagos hematogênicos durante os primeiros estágios da degeneração Walleriana. Por exemplo, o aumento da regulação da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) é detectado muito precocemente após a lesão no nervo e é essencial para o recrutamento de macrófagos e a remoção dos *debris* de mielina. Além disso, citocinas pró-inflamatórias atravessam a BHN e aumentam a permeabilidade vascular para promover o recrutamento de células do sistema imunológico para dentro do nervo lesionado (TASKINEN; ROYTТА, 2000).

Ademais, citocinas neuropoiéticas, como o fator inibitório da leucemia (LIF) e a IL-6, também estão envolvidas no recrutamento de células do sistema imunológico. Estas citocinas podem ter tanto características pró quanto anti-inflamatórias e são fundamentais na hematopoiese, na resposta da fase-aguda e na resposta imune após a lesão (TOFARIS et al., 2002). A IL-6 é importante para a diferenciação, sobrevivência e regeneração do nervo após a lesão, no entanto desempenha um importante papel na dor crônica (HEINRICH et al., 1998). A IL-6 é sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos, dentre outras células, em resposta a sinais, como IL-1 β , TNF- α e PGs (ZUMWALT; THUNSTROM; SPANGELO, 1999; MURPHY et al., 1999).

A IL-6 pode ser produzida localmente, no sítio da lesão e centralmente, visto que o RNAm e a proteína IL-6 foram encontradas principalmente em neurônios, no entanto a microglia e os astrócitos também são fontes conhecidas de IL-6 (FREI et al., 1989; DELEO et al., 1996; ARRUDA et al., 1998; ZUMWALT; THUNSTROM; SPANGELO, 1999). Murphy et al. (1995) demonstraram que após uma lesão no SNP o aumento nos níveis de RNAm de IL-6 é uma das alterações mais precoces observadas no GRD e no encéfalo. Estudos demonstraram que a injeção de IL-6 em ratos, por via intraplantar, e em camundongos, por via intramuscular, induziu hiperalgesia mecânica

dependente da dose (CUNHA et al., 1992; MANJAVACHI et al., 2010). Ademais, foi evidenciado que, dentro de 3 horas após uma lesão por esmagamento do nervo isquiático, a IL-6 foi produzida tanto distalmente, quanto proximalmente, no local da lesão (DELEO et al., 1996).

Figura 2 - Eventos no processo de degeneração Walleriana distal



Legenda: Alterações inflamatórias associadas ao processo de degeneração Walleriana. As células de Schwann e macrófagos produzem metaloproteases de matriz que aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica. O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a substância P (SP), a bradicinina e o óxido nítrico (NO) são liberados do coto proximal das fibras nervosas lesionadas e induzem hiperemia, edema e promovem diapedese de mais linfócitos T e monócitos. As quimiocinas CCL2 (quimiocina C-C motif ligante 2) e CCL3 atraem e orientam os monócitos para o local da lesão. Os macrófagos e os mastócitos liberam prostaglandinas (PGs) e citocinas, tais como IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF e LIF. O TNF tem efeito autócrino sobre os macrófagos, que é mediado pela ativação do receptor TNFR1, aumentando a síntese e liberação de citocinas. O TNF promove ainda, uma infiltração adicional de macrófagos.

Fonte: Adaptado de Scholz e Woolf (2007).

Estudos demonstraram que, 14 dias após a lesão por constrição crônica, esmagamento e axoniotomia do nervo isquiático de ratos, ocorre um aumento da regulação da IL-6 no nervo isquiático, concomitante com a hiperalgesia mecânica, e as células de Schwann próximas do local da lesão são responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias (CUI et al., 2000; BOLIN et al., 1995). Além disso, concentrações elevadas de IL-6 foram encontradas no corno dorsal e ventral, tanto do lado ipsilateral quanto contralateral da medula espinal, após a lesão do nervo isquiático. Este aumento foi paralelo ao comportamento de hiperalgesia nos animais (DELEO et al., 1996). A IL-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória, no entanto, ela também pode ter algumas características anti-inflamatórias. Por exemplo, a IL-6, bem como o LIF e o fator neurotrófico ciliar, inibiram a expressão de TNF- α em modelos de inflamação induzidos por LPS (ADERKA; LE; VILCEK, 1989; BENIGNI et al., 1995).

1.4 PAPEL DOS ASTRÓCITOS E DA MICROGLIA NA DOR NEUROPÁTICA

Como descrito anteriormente, após uma lesão de nervos espinais, a resposta neuronal anormal nas vias de transmissão da dor promove a sensibilização de nociceptores na periferia e, conseqüentemente, a plasticidade sináptica no sistema nervoso central (SNC), levando a sensibilização central, o que contribui significativamente para a dor neuropática (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). No entanto, nos estados de dor neuropática o neurônio não é a única célula envolvida, as células gliais, incluindo astrócitos e microglia são células efetoras na iniciação e manutenção da dor neuropática (MARCHAND; PERRETTI; MCMAHON, 2005). Estas células gliais tem uma relação íntima com os neurônios e assim modulam a transmissão da dor, particularmente em condições patológicas (INOUE; TSUDA, 2009; MCMAHON; MALCANGIO, 2009; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

As células gliais são células especializadas encontradas no SNP (células de Schwann, células satélites e a glia perineuronal) e SNC (oligodendrócitos, astrócitos, microglia e células endimárias). No SNC as células da glia constituem cerca de 70% da população total e podem ser subdivididas em duas classes principais: microglia (5 – 10% da população glial) e macroglia, que inclui os astrócitos e oligodendrócitos (MOALEN; TRACEY, 2006).

No SNC saudável os astrócitos funcionam como células suporte para os neurônios e são responsáveis por uma grande variedade de funções complexas e essenciais, incluindo o desenvolvimento e a manutenção do tecido neural, por fornecer nutrientes e substratos, regular as funções metabólicas e, até mesmo, regular o ambiente químico extracelular durante a transmissão sináptica (NAIR; FREDERICK; MILLER, 2008). Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC e é estimado que um único astrócito possa envolver até 140.000 sinapses e de 4 a 6 corpos neuronais, além de fazer contato com 300 a 600 dendritos neuronais em roedores (BUSHONG et al., 2002; GAO; JI, 2010). Um clássico marcador para a identificação imunistoquímica de astrócitos é a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um membro da família de proteínas de filamentos intermediários, a qual inclui a vimentina e a nestina, entre outras, que servem em grande parte para a citoarquitetura da célula (PEKNEY; PEKNA, 2004).

As células microgлияis são referidas como os macrófagos especializados do SNC que se originam a partir de monócitos derivados da medula óssea que migram durante o desenvolvimento perinatal (ASHWELL, 1991). Dependendo do estímulo inicial, estas células podem ser tróficas ou citotóxicas, ou seja, quando estão totalmente ativadas são prejudiciais para os neurônios, no entanto, na sequência do estado reativo, elas podem melhorar a sobrevivência neuronal, liberando fatores tróficos ou removendo o excesso de glutamato do espaço extracelular (MILLIGAN; WATKINS, 2009; AAMODT, 2007). Estudos sugerem que a microglia interage dinamicamente com as sinapses para modular as suas estruturas e funções no SNC saudável (TREMBLAY; LOWERY; MAJEWSKA, 2010) e controla a sinaptogênese (ROUMIER et al., 2004). Estas células, portanto, são importantes para o desenvolvimento e manutenção do SNC.

Notavelmente, as células microgлияis se tornam mais ativadas após lesões ou patologias, exibindo alterações morfológicas que variam da forma ameboide para a ramificada, sugerindo que a morfologia por si só, pode não identificar esse grupo celular (SIEVERS; PARWARESCH; WOTTGE, 1994; BOHATSCHEK et al., 2001). Marcadores de progenitores mieloides, tais como o cluster de diferenciação 11b (CD11b), o complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) e a molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1) aumentam a sua regulação e são utilizadas para identificar a microglia ativada no SNC (HANISCH; KETTENMANN, 2007; SUTER et al., 2007).

A ativação de astrócitos e microglia pode ocorrer devido a alterações do estado fisiológico de repouso, tais como traumas no SNC e

SNP, isquemia, inflamação, infecção ou doenças neurodegenerativas. Na maioria das vezes, a ativação destas células gliais está implicada no desenvolvimento, propagação e potenciação da dor crônica e neuropática (RAGHAVENDRA; TANGA; DELEO, 2004; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001; MILLIGAN et al., 2000; CHACUR et al., 2001) e tem sido evidenciada em vários modelos, incluindo o modelo de lesão do nervo espinal (RAGHAVENDRA; TANGA; DELEO, 2003; CLARK et al., 2007).

Em situações como as lesões de nervos espinais, ocorre uma intensa e repetitiva comunicação sináptica entre os neurônios aferentes primários e os neurônios de projeção na medula espinal, liberando neurotransmissores, tais como: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), glutamato, serotonina (5 hidroxitriptamina, 5-HT) (liberada das vias descendentes) e ATP (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Estes neurotransmissores iniciam a ativação das células gliais na área da sinapse e depois sensibilizam os neurônios pós-sinápticos. Vários mecanismos pelos quais as células gliais são ativadas têm sido sugeridos. Estes incluem a liberação de mediadores bioquímicos (por exemplo, SP, CGRP, NO, ATP, glutamato, citocinas pró-inflamatórias e peptídeos opioides endógenos) no local da lesão, os quais são transportados pela via aferente afetando a transmissão sináptica e promovendo a ativação de células gliais (GUO et al., 2007; MILLIGAN; WATKINS, 2009; JOURDAIN et al., 2007; FIELDS; BURNSTOCK, 2006; HOLGUIN et al., 2004). O ATP liberado por neurônios aferentes causa migração e ativação da microglia, produzindo um aumento intracelular de cálcio e do BDNF, o qual resulta na ativação e translocação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) para o núcleo, iniciando a expressão de numerosos agentes pró-inflamatórios, tais como IL-1 β e TNF- α (MILLIGAN; WATKINS, 2009). O NO age similarmente sobre o NF- κ B em astrócitos, afetando a expressão gênica e induzindo a sua ativação (GUO et al., 2007; HOLGUIN et al., 2004). Os neurônios sensoriais submetidos aos estímulos dolorosos liberam SP que ativa a glia no SNC, via receptor de neurocinina-1 (NK-1). Outros mediadores bioquímicos, tais como ATP, glutamato e peptídeos opioides, induzem a ativação das células gliais por interação direta com os seus receptores de membrana específicos (MILLIGAN; WATKINS, 2009).

Agentes pró-inflamatórios gerados e liberados pelas células gliais ativadas também podem ativar células gliais vizinhas. Além disso, lesões nos nervos espinais resultam na ativação de astrócitos no complexo trigeminal do tronco encefálico (CAO; DELEO, 2008). Um

grupo de pesquisadores demonstrou que o bloqueio proximal dos inputs aferentes primários, após uma lesão no SNP, falhou em inibir a ativação glial, tanto na medula espinal quanto em níveis supraespinais. Estes estudos sugeriram que astrócitos supraespinais ativados podem potencialmente induzir a dor neuropática pela ativação das células gliais na medula espinal via facilitação da modulação descendente de controle da dor (WEI et al., 2008; YIN et al., 2014). Lesões no SNP podem promover o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), permitindo que monócitos migrem do sangue, se proliferem e diferenciem-se em células gliais ativas no encéfalo (CAO; DELEO, 2008; GORDH; CHU; SHARMA, 2006).

Uma vez ativadas, as células gliais alteram sua morfologia, através da hipertrofia e retração dos seus prolongamentos, sintetizando marcadores celulares específicos e cinases, algumas tendo um papel ativo na iniciação e potenciação da resposta imune. Estas células ativadas liberam mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas, PGs, ATP, NO, BDNF e glutamato (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Estes agentes desempenham um papel crítico no desenvolvimento e na manutenção da sensibilização central e hiperalgesia, por alterar características da polarização de neurônios aferentes e assim, modular a transmissão do estímulo doloroso no SNC (HOLGUIN et al., 2004; PEREA; ARAQUE, 2007; PARPURA et al., 1994).

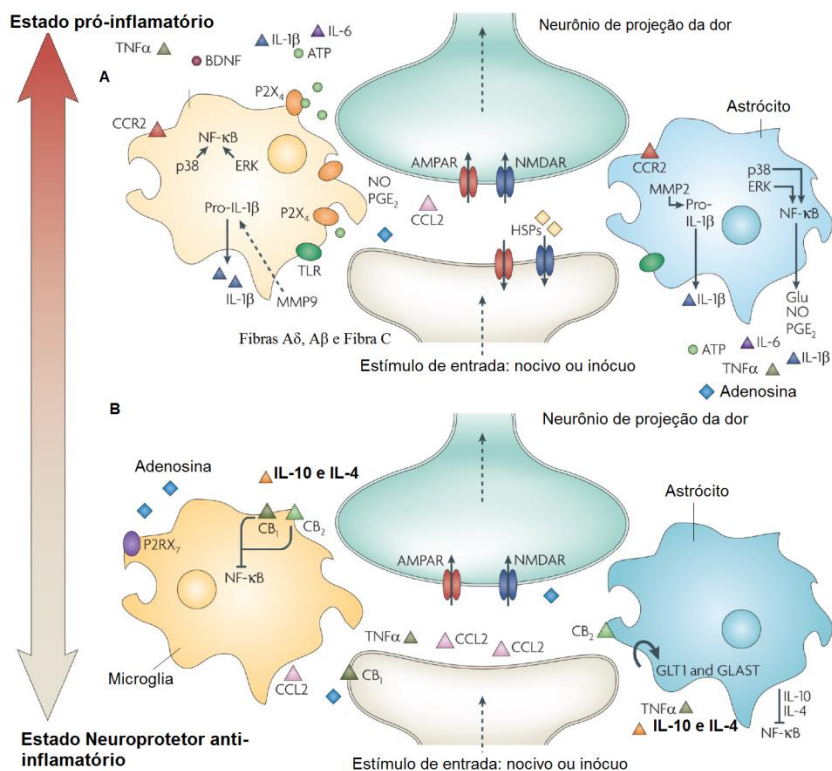
De fato, alguns estudos sugerem que a microglia está envolvida no desenvolvimento da dor neuropática, enquanto que o astrócito é responsável pela sua manutenção (COLBURN; RICKMAN; DELEO, 1999; RAGHAVENDRA; TANGA; DELEO, 2003; 2004;). A ativação microglial leva a liberação de proteínas de sinalização, tais como IL-1 β , IL-18 e TNF- α dentro do interstício celular. Estas proteínas se ligam em receptores específicos na membrana dos astrócitos e iniciam a ativação celular (SAMA et al., 2008; SCHUBERT et al., 2000). Após a ativação, ocorre um ciclo de *feedback* positivo, no qual os astrócitos liberam mediadores inflamatórios, os quais podem ativar outras células gliais (SAMA et al., 2008). A ativação de astrócitos é acompanhada por uma redução na atividade da microglia ao longo do tempo (TANGA; RAGHAVENDRA; DELEO, 2004) (Figura 3A).

Por outro lado, dependendo do contexto pelo qual a microglia é estimulada, podem ocorrer padrões distintos de ativação. Por exemplo, enquanto o LPS induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais induzem processos que levam a morte das células infectadas, e também, as não infectadas; a ativação glial gerada por fatores de

crescimento, bem como citocinas anti-inflamatórias como IL-4 ou IL-10, promovem a sobrevivência neuronal (Figura 3B). Assim, em alguns casos, a inibição da ativação glial no SNC não é desejável, e poderia amplificar ou criar um estado de dor crônica. Neste sentido, pesquisas que demonstram resultados interessantes estão sendo conduzidas visando alvos específicos de ativação glial, os quais estimulam processos anti-inflamatórios (por exemplo, produção ou regulação de citocinas) para o uso terapêutico (MILLIGAN et al.; 2006; GOSS; GOINS; GLORIOSO, 2007; MATA; HAO; FINK, 2008).

Neste contexto, têm se observado que a administração, diretamente na medula espinal, de genes de citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10, IL-4 e o receptor solúvel de TNF, o qual se liga ao TNF- α , impedindo desse modo a sua ação, conduz a uma inversão robusta e sustentada da dor neuropática em roedores (MILLIGAN et al., 2006; MATA; GOSS; GOINS; GLORIOSO, 2007; HAO; FINK, 2008). Além disso, alvos terapêuticos como os receptores canabinoides CB1 e CB2 têm sido explorados em doenças neurodegenerativas inflamatórias, bem como na dor neuropática (MANZANARES; JULIAN; CARRASCOSA, 2006; ROMERO-SANDOVAL; HORVATH; DELEO, 2008). Os receptores CB2 são expressos na microglia e em astrócitos e a sua ativação promove efeitos benéficos em modelos animais de dor neuropática, promovendo uma ativação anti-inflamatória (ASHTON; GLASS, 2007). Deste modo, sugere-se que terapias que promovam a alteração do estado pró- para o anti-inflamatório podem ser uma ação terapêutica adequada para inibir a dor neuropática e a sensibilização central em pacientes.

Figura 3 - Ativação Glial: do estado pró- ao anti-inflamatório



Legenda: (A) O papel da glia pró-inflamatória. Se o estímulo nocivo persiste, como no caso de inflamação crônica ou lesão do nervo, a sensibilização central sustentada leva a alterações transcricionais em neurônios do corno dorsal da medula espinal que alteram suas funções por períodos prolongados. Os astrócitos respondem a esta atividade sináptica contínua através da mobilização interna de cálcio, levando à liberação de glutamato (Glu), ATP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, NO e PGE₂. A microglia ativada também é fonte de todos esses fatores pró-inflamatórios. A metaloproteinases matriz 9 (MMP9) induz a clivagem da pró-IL-1 β e a ativação da microglia, enquanto que a MMP2, induz a clivagem da pró-IL-1 β e mantém a ativação de astrócitos. A ativação da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) é induzida em ambos os tipos celulares, microglia e astrócitos, na sinalização da IL-1 β . Astrócitos e microglia expressam os receptores de quimiocinas CX3CR1 (não mostrado) e CCR2 e tornam-se ativados após a ligação com as respectivas quimiocinas.

Continuação da legenda da Figura 3.

Após a lesão do nervo, proteínas de choque térmico (HSPs) são liberadas e podem se ligar aos receptores Toll-like (TLRs), expressos em astrócitos e microglia, levando a uma maior ativação desses tipos celulares. Em células quiescentes (não mostrado), o fator nuclear- κ B (NF- κ B) é sequestrado no citosol pelo inibidor de κ B (I κ B), que se liga a regiões específicas do NF- κ B e, deste modo evita a exposição do sinal para a translocação nuclear. Pela estimulação de citocinas pró-inflamatórias, proteínas I κ B são fosforiladas, o que leva à sua degradação. Como consequência, o NF- κ B transloca-se para o núcleo e liga-se a elementos dos promotores de genes alvo, conduzindo à ativação de genes de citocinas pró-inflamatórias. (B) O papel anti-inflamatório da glia ativada. Estas células podem liberar citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e IL-4 e expressam receptores de canabinóides (CB₁ e CB₂) que exercem funções anti-inflamatórias e inibem a toxicidade da microglia por suprimir a resposta quimiotática e a transdução do sinal de MAPK, com consequente inibição de citocinas pró-inflamatórias. Os transportadores de glutamato, o transportador de glutamato 1 (GLT1) e o transportador de glutamato-aspartato (GLAST), podem normalizar os níveis de glutamato. A ativação de purinoreceptores microgliais P2X₇R por ATP conduzem à liberação de TNF- α , que protege os neurônios contra a toxicidade induzida por glutamato. Os astrócitos ativados reduzem a propagação da degeneração do tecido após a lesão direta através da remoção controlada de neurônios mortos e restos de tecido, outro efeito neuroprotetor.

Fonte: Adaptado de Milligan e Watkins (2009).

1.5 MECANISMOS ENDÓGENOS DE CONTROLE DA DOR

Ao longo da história, a modulação endógena da dor tem sido vista como a atenuação da transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinal, através de vias descendentes inibitórias provenientes de estruturas encefálicas. A teoria de Melzack e Wall do “portão da dor” lançou esta ideia em 1965 (MELZACK; WALL, 1965). Atualmente está bem definido que a modulação endógena da dor pode ocorrer em todos os níveis do sistema nervoso. Nos terminais periféricos, diversos mediadores endógenos com efeitos pró- ou antinociceptivos, como por exemplo, citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-1ra), PGs, opioides, adenosina e endocanabinóides, podem ser liberados por células locais lesionadas, células do sistema imunológico recrutadas para o local da lesão e até mesmo pelos queratinócitos da pele, contribuindo para o equilíbrio entre a facilitação e a inibição da dor (MOUSA et al., 2004).

No corno dorsal da medula espinal, os sinais nociceptivos podem ser inibidos através de interneurônios que liberam o ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina ou opioides, modulando a transmissão em neurônios de projeção espinotalâmicos e espinobulbares (BASBAUM, 1981). Além disso, sistemas descendentes originários do tronco encefálico, em estruturas que incluem a PAG, o RVM e o tegmento pontino dorso lateral exercem inibição dos estímulos nociceptivos na medula espinal (SLUKA, 2009).

Anatomicamente, a PAG, que expressa grande quantidade de encefalinas e receptores opioides, envia projeções para o RVM, especialmente para a porção do núcleo magno da rafe (RMg) e núcleos adjacentes, bem como para os núcleos A₆ e A₇ noradrenérgicos, que também fazem comunicação direta com o RVM. O RVM e os núcleos A₆ e A₇ se projetam para a medula espinal e modulam a atividade de neurônios do corno dorsal e, por fim, a informação nociceptiva, por meio de fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas. É sabido que existe um balanço entre a facilitação e a inibição da dor através das vias ascendentes e descendentes (Figura 4) (OSSIPOV, 2012). Este balanço é alterado após lesões teciduais de uma maneira dependente do tempo, a qual pode resultar em aumento da facilitação ou da inibição da dor (SLUKA, 2009).

O controle inibitório central da dor foi inicialmente descoberto por Reynolds (1969), o qual observou que a estimulação elétrica na PAG produzia analgesia em ratos. Outros estudos também evidenciaram que a estimulação elétrica ou química da PAG ou RVM causava analgesia em ratos, cães e humanos (DUBUISSON; MELZACK, 1977; FARDIN; OLIVERAS; BESSON, 1984; REYNOLDS, 1969) através da inibição dos neurônios espinais que respondem aos estímulos nocivos (AIMONE; JONES; GEBHART, 1987; LIGHT; CASALE; MENETREY, 1986; LIGHT; CASALE; MENETREY, 1986). A 5-HT é o neurotransmissor mais abundante encontrado no RVM, tanto em neurônios que descendem para a medula espinal quanto nas projeções da PAG para o RVM (BASBAUM, 1981; BEITZ, 1982). Foi demonstrado que a 5-HT, administrada na medula espinal reduz a atividade de neurônios do corno dorsal e produz analgesia (MILLAN, 2002). Na medula espinal, múltiplas famílias de receptores de 5-HT (5-HT₁R, 5-HT₂R, 5-HT₃R, 5-HT₄R, 5-HT₅R, 5-HT₆R e 5-HT₇R) estão presentes e o papel dos subtipos específicos de receptores para 5-HT na transmissão da nociceção é controverso, pois este neurotransmissor tem sido implicado tanto na facilitação, quanto na inibição da nociceção

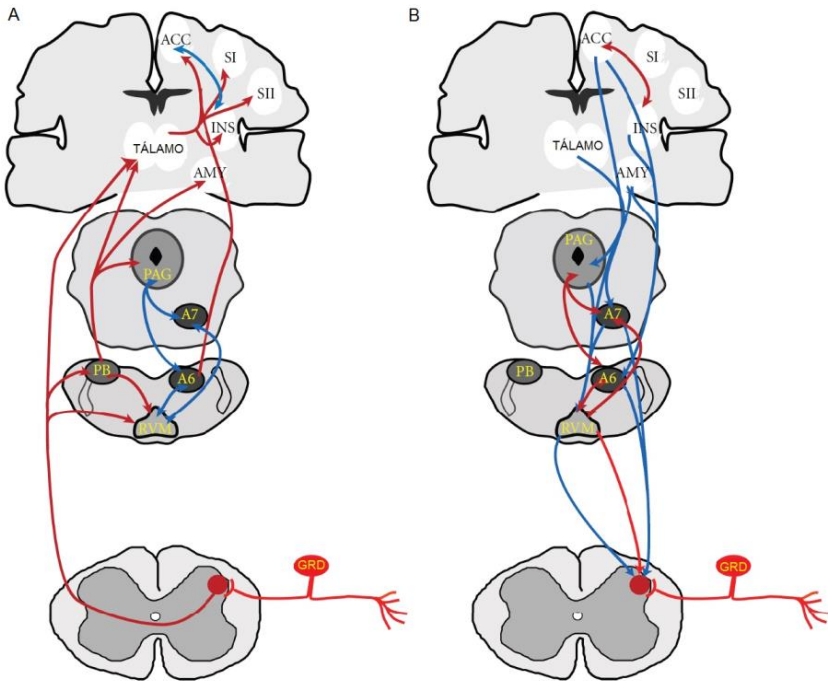
(ALHAIDER; LEI; WILCOX, 1991; ALHAIDER; WILCOX, 1993; CALEJESAN; CH'ANG; ZHUO, 1998).

A maioria dos estudos evidenciou o efeito da 5-HT nos receptores da medula espinal, no entanto, subtipos de receptores como o 5-HT_{1A}R, 5-HT_{1C}R e 5-HT₂R também foram encontrados em regiões do tronco encefálico como no RVM (PAZOS; CORTES; PALACIOS, 1985; PAZOS; PALACIOS, 1985; HOFFMAN; MEZEY, 1989; THOR; BLITZ-SIEBERT; HELKE, 1990), e 5-HT₃ no núcleo dorsal da rafe, amígdala, entre outros (LAPORTE et al., 1992).

Além da PAG e do RVM, outros núcleos no encéfalo também inibem a nociceção e a dor quando ativados (Figura 4). Estes núcleos incluem o núcleo pré-tectal anterior, o grupo de células A7 do *locus coeruleus*, hipotálamo, córtex somatosensorial, núcleo rubro, amígdala, trato retículoespinal e rubroespinal. A maioria desses núcleos se comunica direta ou indiretamente com o RVM, o qual serve como uma via final comum que se projeta para a medula espinal (DAFNY et al., 1996; DESALLES et al., 1985; GRAY; DOSTROVSKY, 1984, OSSIPOV, 2012).

O tegmento pontino dorsolateral também envia projeções diretas para a medula espinal, principalmente do *locus coeruleus* e núcleo sub-coeruleus, utilizando a NA como o seu neurotransmissor. A estimulação elétrica e química destes núcleos também causa analgesia, reduz a hiperalgesia e diminui a atividade de neurônios do corno dorsal da medula espinal envolvidos na transmissão da dor (JONES; GEBHART, 1987; LI; ZHAO, 1993; TSURUOKA; WILLIS, 1996). A NA pode inibir ou facilitar o estímulo nociceptivo, dependendo da sua ação em receptores adrenérgicos específicos na medula espinal. Foi demonstrado que a sua ação em receptores α_2 -adrenérgico inibe o estímulo nociceptivo, por outro lado, a ativação de receptores α_1 -adrenérgico medeia a facilitação descendente (NUSEIR; PROUDFIT, 2000).

Figura 4 - Principal sistema modulatório ascendente e descendente da dor



Legenda: Representação esquemática do principal sistema modulatório ascendente (A) e descendente da dor (B). Os inputs nociceptivos entram no SNC pelo corno dorsal da medula espinhal onde os terminais dos neurônios aferentes primários fazem sinapse com os neurônios de projeção de segunda ordem. O trato ascendente (A) é representado em vermelho e as setas em azul representam as comunicações bilaterais. A projeção descendente (B) é mostrada em azul e as setas em vermelho indicam as comunicações bilaterais. As projeções em vermelho e azul do RVM para a medula espinhal sugerem a facilitação descendente e a inibição descendente, respectivamente. As regiões ilustradas são os núcleos A6 e A7 noradrenérgicos, ACC: córtex cingulado anterior; AMY: amígdala; GRD: gânglio da raiz dorsal; INS: córtex insular; PAG: substância cinzenta periaquedutal; PB: núcleo parabraquial; RVM: bulbo rostrorodentomedial; SI: córtex sensorial primário; SII: córtex somatosensorial secundário.

Fonte: Adaptado de Ossipov (2012).

1.6 MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA E REGENERAÇÃO NERVOSA

O esmagamento do nervo isquiático é um modelo experimental comum de lesão que resulta na interrupção axonal, mantendo a integridade dos tecidos conectivos e do epineuro, sendo classificada como axoniotmese (Figura 5B). Portanto, a continuidade anatômica entre o coto proximal e distal do nervo lesionado é mantida, permitindo o brotamento axonal (ZOCHODNE, 2008; KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Como mencionado anteriormente, estas lesões levam a uma série de reações induzidas pela lesão axonal (reação axonal) que começam a ocorrer nos neurônios sensoriais e motores, principalmente no corpo celular, no local e distalmente à lesão. Este processo é conhecido como degeneração Walleriana distal e promove a degeneração deste segmento, fornecendo um ambiente celular e molecular apropriado para o processo de regeneração axonal após a lesão (IDE, 1996).

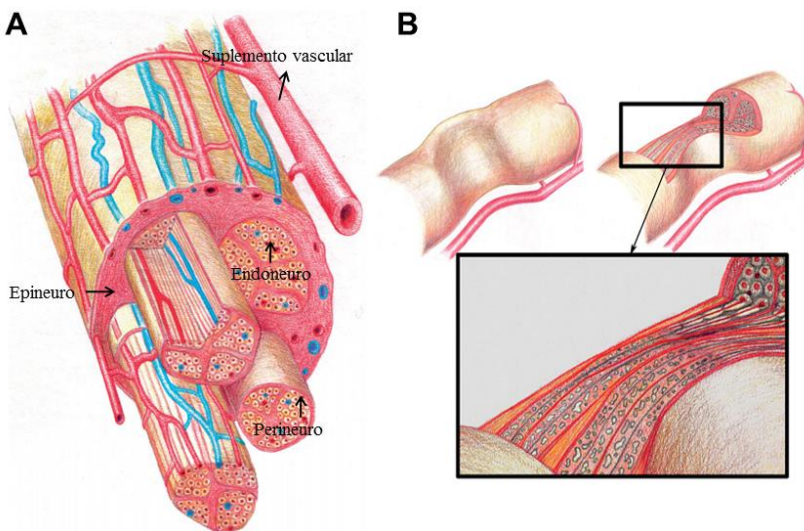
A degeneração Walleriana seguida do esmagamento do nervo ocorre lentamente. No entanto, o crescimento axonal após a lesão por esmagamento do nervo é mais rápida do que lesões que resultam na descontinuidade anatômica do nervo, conhecidas como neurotmese. A regeneração axonal neste modelo geralmente é bem sucedida e se inicia, normalmente, depois de um período de latência curto de 1 a 2 dias, em que os axônios se regeneram a uma taxa constante, ao longo do segmento do nervo distal. Eles são auxiliados pelas células de Schwann reativas e pelos tubos endoneurais preservados, os quais aumentam o alongamento axonal e facilitam a reinervação adequada e a recuperação funcional (LUNN; BROWN; PERRY, 1990).

O número e o tamanho dos axônios, bem como a recuperação da função podem ocorrer naturalmente após a lesão por esmagamento do nervo em ratos e camundongos (VALERO-CABRE et al., 2004). George, Buehl e Sommer (2004) demonstraram que neste modelo, em camundongos, ocorre um período transitório de hipoestesia mecânica e hipoalgesia ao calor até o terceiro dia após a lesão, seguido pelo desenvolvimento de alodinia mecânica e hiperalgesia térmica ao calor, até aproximadamente 14 dias. No entanto, nossos estudos anteriores demonstram que a hipersensibilidade mecânica e ao frio, perdurou por aproximadamente 28 dias após a lesão (BOBINSKI et al., 2011b).

As lesões traumáticas experimentais utilizando o nervo isquiático de ratos e camundongos são amplamente empregadas, pois a anatomia e a constituição tecidual dos nervos desses roedores são bastante conhecidas e, em geral, muito similares aos nervos de humanos, exceto

pelo tamanho e pela densidade de tecido conjuntivo (Figura 5A) (MACKINNON; HUDSON; HUNTER, 1985). Desta maneira, as lesões por esmagamento do nervo são ferramentas apropriadas para a investigação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de regeneração nervosa periférica e da dor neuropática (GEORGE; BUEHL; SOMMER, 2004; UDINA, 2003), bem como para testar terapias que favoreçam os processos de regeneração do nervo e reduzam os sintomas da dor neuropática, que persistem após a lesão.

Figura 5 - Componentes estruturais dos nervos espinais e modelo de lesão nervosa induzida pelo esmagamento do nervo



Legenda: O painel A demonstra os componentes estruturais dos nervos espinais, e a sua divisão em três compartimentos contidos por tecido conjuntivo: o endoneuro, o perineuro e o epineuro. O painel B demonstra a lesão axonal por esmagamento do nervo (axioniotmese), do segmento distal ao centro da lesão aparece o processo de degeneração Walleriana.

Fonte: Desenhado por Scott Rogers, em Zochodne (2008).

1.7 EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico é conceituado como toda atividade física planejada, estruturada e repetitiva que tem o objetivo de melhorar ou manter da aptidão física (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985). É um estresse fisiológico à homeostase e aos processos biológicos sistêmicos, pois representa o maior determinante da utilização de substratos metabólicos acima do nível de repouso (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000).

Atualmente, o exercício físico regular tem sido reconhecido como uma abordagem capaz de beneficiar positivamente a saúde física e mental, melhorando a qualidade de vida e diminuindo a incidência de doenças relacionadas ao estilo de vida sedentário, tais como diabetes e obesidade (RADÁK et al., 2006; MEDEIROS et al., 2011). Ademais, promove neuroproteção (HAYES et al., 2008), neuroplasticidade (ROJAS VEGA et al., 2006), neurogênese (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999), auxilia no controle de algumas condições dolorosas (WRIGHT; SLUKA, 2001), além de melhorar o aprendizado e a cognição (VAN PRAAG et al., 1999; DAVRANCHE; MCMORRIS, 2009). Todos estes benefícios são resultados de uma resposta coordenada de múltiplos sistemas, incluindo o cardiovascular, pulmonar, endócrino-metabólico, neuroendócrino, imunológico e músculo esquelético (BILLAT et al., 2005).

Em contraste, a inatividade física foi identificada como o quarto principal fator de risco para a mortalidade global (6% das mortes) (SHARAN et al., 2009) e agora é aceito como um fator de risco importante para o desenvolvimento de muitas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, depressão, câncer e diabetes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). De fato, a atividade física geralmente é reduzida em pessoas com doenças crônicas, muitas vezes devido à dor crônica (ELLINGSON et al., 2012). Por outro lado, um maior nível de atividade física está associado a um menor risco de desenvolvimento de dor crônica (LANDMARK et al., 2001; 2013).

1.8 EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA REGENERAÇÃO E NA PLASTICIDADE APÓS A LESÃO DE NERVOS ESPINAIS

Várias formas de terapias físicas, incluindo o exercício físico, são utilizadas na reabilitação de pacientes para ajudar a manter as propriedades musculares durante a desnervação ou paralisia, e promover

a recuperação funcional após lesões nervosas ou em doenças neurodegenerativas (para revisão: ARMADA-DA-SILVA et al., 2013; ALLEN et al., 2015). Nas lesões de nervos espinais, durante o período de regeneração-reinervação, a melhora dos *inputs* sensoriais e ou da atividade motora por meio de eletroestimulação ou exercício físico, influencia positivamente a função neuromuscular após lesões neurais experimentais (MARQUESTE et al., 2004; ASENSIO-PINILLA et al., 2009; BOBINSKI et al., 2011b). A reabilitação das funções motoras e sensoriais, por meio de programas de exercício físico pode, eventualmente, levar a uma melhor coordenação das tarefas sensório-motoras e restauração adequada das conexões sinápticas ao nível da medula espinal.

Lesões de nervos espinais induzem a desnervação dos músculos esqueléticos afetados, esta, por sua vez, leva a uma atrofia muscular progressiva, com perda da massa muscular, redução da área de secção transversa e alterações nas características mecânicas e bioquímicas do músculo (BOUDRIAU et al., 1996; MARQUESTE et al., 2006). Manter a atividade muscular, mesmo através de exercício passivo, durante o período de desnervação pode melhorar a reabilitação neuromuscular (MARTINS et al., 2011), além de que, pode resultar em liberação autócrina de neurotrofinas (por exemplo, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 [IGF-1] e BDNF) evitando os efeitos do desuso muscular seguido de uma lesão de nervos espinais (MCKOY et al., 1999; GOLDSPINK; YANG, 2001; GOMEZ-PINILLA et al., 2002).

No entanto, uma visão geral da literatura mostra evidências conflitantes sobre os efeitos benéficos e deletérios do exercício físico na regeneração de nervos espinais e reinervação muscular. As variações no tipo de lesão do nervo, tipo de exercício aplicado, tempo (duração e início do tratamento) e intensidade do treinamento parecem ser os principais fatores que explicam os resultados controversos relatados. Por exemplo, um longo prazo de hiperatividade muscular, induzida pela secção do tendão de músculos sinergistas (HERBISON et al., 1973), natação intensiva (GUTMANN; JAKOUBEK, 1963; HERBISON; JAWEED; DITUNNO, 1974) ou treinamento na esteira (HERBISON; JAWEED; DITUNNO, 1980a, b) por 2-6 semanas após a lesão por esmagamento do nervo isquiático em roedores mostraram efeitos deletérios na recuperação da função muscular. Por outro lado, camundongos que se exercitaram voluntariamente, após a transecção e sutura do nervo isquiático, inicialmente mostram um atraso na reinervação, enquanto que em estágios posteriores, ocorreu uma melhora na maturação do nervo (BADKE; IRINTCHEV; WERNIG, 1989). O

exercício voluntário produz redução no peso e força do músculo extensor longo do hálux e, por outro lado, aumento da força e peso do músculo sóleo; estas mudanças são típicas do treinamento aeróbio e podem ser interpretadas como benéficas (IRINTCHEV; DRAGUHN; WERNIG, 1990; IRINTCHEV; CARMODY; WERNIG, 1991). Consistente com estas observações, outros estudos relataram os efeitos benéficos do exercício voluntário na recuperação da função sensorial e motora (MOLTENI et al.; 2004; VAN MEETEREN et al., 1997).

O nosso grupo de pesquisa demonstrou que o exercício físico de baixa intensidade (velocidade de 10 m/min, durante 30 minutos por dia) realizado na esteira, sob três programas diferentes: i) duas semanas antes da lesão por esmagamento do nervo isquiático; ii) duas semanas antes e duas semanas após a lesão e iii) duas semanas após a lesão do nervo, foi capaz de melhorar a função motora e sensorial do nervo isquiático. No entanto, a recuperação de todos os parâmetros morfológicos avaliados no nervo foi observada no grupo que realizou exercício antes e após a lesão, bem como, o grupo que realizou exercício físico somente após a lesão, aumentou o número de fibras mielinizadas (BOBINSKI et al., 2011b). Além disso, dados da literatura demonstraram que o treinamento de baixa, mas não o de alta-intensidade, potencializa a proliferação de células de Schwann no nervo isquiático em processo de regeneração em ratos (SEO et al., 2009), bem como, promove o alongamento axonal após a transecção e reparo, em camundongos (SABATIER et al., 2008).

Em conjunto, estes estudos nos fornecem uma base para a hipótese de que, quando o exercício físico de moderada ou baixa intensidade é iniciado na fase de desnervação (precocemente após a lesão), resulta em uma recuperação acelerada da função sensorial e motora, com efeitos benéficos no crescimento axonal, maturação do nervo e recuperação das propriedades contráteis, enquanto que o exercício intenso forçado tende a ter um efeito deletério, especialmente sobre a função muscular, ou até mesmo, danificando os músculos parcialmente desnervados. Além disso, a maioria dos estudos em roedores submete os animais ao exercício num período de 3 a 5 dias após a lesão, para evitar possíveis danos na estrutura do nervo e também pela falta de evidências de que o exercício é benéfico em fases muito precoces após a lesão (HERBISON et al., 1973; IRINTCHEV; CARMODY; WERNIG, 1991; VAN MEETEREN et al., 1997).

Em relação aos mecanismos de ação, Molteni et al. (2004) constataram que neurônios do GRD apresentaram maior crescimento dos neuritos quando cultivados a partir de animais que haviam sido

submetidos a 3 ou 7 dias de exercício físico em comparação aos animais sedentários. Os GRDs de animais exercitados apresentaram maior expressão do RNAm de BDNF, de neurotrofina-3 (NT-3) e da proteína associada ao crescimento-43 (GAP-43) do que os GRDs de animais sedentários. A inibição da atividade do receptor de neurotrofina TrK (receptor de tropomiosina cinase) antes da realização do exercício físico atenuou o crescimento de neuritos, indicando que a ativação da via de sinalização de neurotrofinas durante o exercício físico desempenha um papel importante na promoção do crescimento e plasticidade de neurônios. Além disso, o exercício físico reduziu significativamente a expressão da glicoproteína associada à mielina (MAG), um potente inibidor do crescimento axonal, sugerindo que a regulação negativa desta proteína, é parte do mecanismo através do qual o exercício reduz a inibição do crescimento (GHIANI et al., 2007). Este efeito foi suprimido, pelo bloqueio da ação do BDNF durante o exercício, o que sugere um papel potencial do BDNF mediando os efeitos do exercício físico sobre o crescimento axonal (CHYTROVA; YING; GOMEZ-PINILLA, 2008).

Desta maneira, sugere-se que, o exercício físico, através da manutenção do trofismo e das propriedades normais dos músculos, poderia facilitar a expressão de sinais musculares para o nervo em processo de degeneração e induzir mudanças plásticas nas conexões sinápticas. Os dados da literatura demonstram os efeitos benéficos do exercício na regeneração nervosa em vários modelos experimentais (MOLTENI et al., 2004; BOBINSKI et al., 2011b; COBIANCHI et al., 2010). No entanto, ainda há muito que descobrir sobre os mecanismos de ação do exercício físico sobre a regeneração nervosa no modelo de lesão por esmagamento do nervo isquiático.

1.9 EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DOR NEUROPÁTICA

Estudos clínicos demonstraram que o exercício físico regular alivia sintomas de dor crônica, como a dor do câncer, dor músculo-esquelética, fibromialgia, dor miofascial, neuropatia diabética, dor lombar, dor após lesão medular ou dor crônica neuropática (CHATZITHEODOROU et al., 2007; HAYDEN; VAN TULDER; TOMLINSON, 2005; KLUDING et al., 2012; NORRBRINK et al., 2012; ROBB et al., 2006). Em modelos animais, o exercício físico regular diminui a hiperalgesia produzida pela dor inflamatória, dor muscular crônica e dor crônica neuropática (COBIANCHI et al., 2010;

KUPHAL; FIBUCH; TAYLOR, 2007; BOBINSKI et al., 2011b; SLUKA et al., 2013). Além disso, a hiponocicepção causada pelo exercício físico tem sido relatada em estudos utilizando uma variedade de estímulos nocivos, incluindo: calor, frio (JANAL et al., 1994; JOHNSON et al., 1997), pressão mecânica (KOLTYN et al., 1996), estimulação elétrica (GUIEU et al., 1992) e isquemia (DROSTE et al., 1988). No entanto, este fenômeno parece variar dependendo da natureza do estímulo nocivo ou da intensidade e duração do exercício (KOLTYN, 2000). Estudos experimentais têm demonstrado uma grande variedade de mecanismos subjacentes ao efeito benéfico do exercício físico em longo prazo sobre a dor aguda e crônica, relatando que o exercício físico reforça a atividade das vias inibitórias descendentes que contêm 5-HT, NA e peptídeos opioides (MAZZARDO-MARTINS et al., 2010; MEEUSEN; DE MEIRLEIR, 1995).

No entanto, poucos estudos têm investigado os efeitos do exercício físico sobre os sintomas de dor neuropática após lesão de nervos espinais, bem como os seus mecanismos de ação. Cobianchi e colaboradores (2010) relataram que, após o modelo de constrição crônica do nervo isquiático em camundongos, o treinamento precoce na esteira durante 7 dias foi capaz de reduzir a alodinia mecânica e normalizar os padrões da marcha. De modo interessante, a redução da alodinia foi mantida por dois meses, mesmo com a interrupção do treinamento na esteira. A redução da alodinia após o exercício físico de curta duração se correlaciona com a redução da reatividade da microglia e de astrócitos no corno dorsal da medula espinal. Por outro lado, o mesmo estudo demonstrou que quando o exercício é realizado por oito semanas, a ativação de astrócitos não foi revertida (COBIANCHI et al., 2010). Estes achados sugerem que a eficácia do exercício físico no tratamento da dor neuropática está relacionada a uma janela de tempo específica após a lesão no nervo, na qual o exercício pode estimular a regeneração axonal.

De fato, dados anteriores do nosso grupo demonstraram que o exercício físico de baixa intensidade realizado na esteira foi capaz de prevenir a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio, após a lesão por esmagamento do nervo isquiático e este efeito foi relacionado à redução de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 β e o TNF- α , no local da lesão e na medula espinal (BOBINSKI et al., 2011b). Na maioria dos estudos, os efeitos da corrida na esteira sobre o comportamento de dor neuropática, são atribuídos à sua modulação central e/ou periférica na liberação de neurotrofinas, assim como na regeneração nervosa.

Neurotrofinas, tais como o BDNF, são reguladas positivamente em vários modelos de dor inflamatória e neuropática (HA et al., 2001; PEZET et al., 2002) e o exercício físico parece ser um importante modulador da liberação de neurotrofinas na regeneração nervosa (MOLTENI et al., 2004; YING et al., 2005). Há evidências de que o BDNF pode ter funções tanto pró, quanto antinociceptivas em diferentes contextos (PEZET; MCMAHON, 2006). Assim, foi relatado que ocorre um aumento da expressão de BDNF no GRD e no corno dorsal da medula espinal, após a lesão de nervos espinais (FUKUOKA et al., 2001; OBATA et al., 2003), o qual está relacionado ao aumento da excitabilidade de neurônios do corno dorsal, por modular a neurotransmissão excitatória glutamatérgica e a inibitória através de GABA/Glicina (LU et al., 2009; LU, COLMERS, SMITH, 2012). Por outro lado, após o exercício físico, a expressão e a liberação de BDNF dependem do local e do modelo de lesão (VANELDEREN et al., 2010). Em nível central, os efeitos analgésicos do BDNF provavelmente são resultantes da sua capacidade de aumentar a síntese e liberação de 5-HT nas vias descendentes de controle da dor ou por regenerar neurônios gabaérgicos, estimulando a liberação de GABA, ambos proporcionando uma modulação inibitória no corno dorsal da medula espinal (PEZET et al., 2002; VANELDEREN et al., 2010).

Além disso, são descritos outros possíveis mecanismos para o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, como, o aumento da atividade inibitória mediada por opioides (MAZZARDO-MARTINS et al., 2010; STAGG et al., 2011), adenosina (MARTINS et al., 2013) ou 5-HT (MAZZARDO-MARTINS et al., 2010) e ainda, a modulação inibitória da transmissão sináptica excitatória através da redução da fosforilação da subunidade NR1 do receptor de glutamato NMDA no RVM (SLUKA et al., 2013), além de alterações na função de canais de cálcio ativados por voltagem (SHANKARAPPA; PIEDRAS-RENTERIA; STUBBS, 2011). De uma maneira geral, a interação que ocorre entre diferentes sistemas poderia atuar de forma coordenada para a redução da dor e manutenção da homeostase corporal. No entanto, apesar da existência de dados experimentais relevantes em modelos de dor neuropática, o mecanismo preciso pelo qual o exercício físico de baixa intensidade na esteira causa analgesia, permanece pouco explorado. A Tabela 1 demonstra um sumário dos efeitos do exercício físico em modelos animais de lesão de nervos espinais, bem como, seus efeitos sobre parâmetros de regeneração nervosa e dor neuropática.

Tabela 1- Sumário dos efeitos do exercício físico em modelos animais de lesão em nervos espinais

| Exercício | Duração | Modelo de lesão/ Espécie animal | Regeneração nervosa | Dor neuropática | Referência |
|----------------------------|--|---|---|----------------------|--|
| Natação | 3 dias | Esmagamento do nervo isquiático/Ratos | ↑Crescimento axonal | ↓ Alodinia, 5-7 sem. | GUTMANN; JAKOUBEK, 1963. HUTCHINSON et al., 2004. |
| | 25 min/dia, 7 sem. | | ↓ Reinervação | | |
| | 2 h/dia, 3-6 sem. 1-2 h/dia, 4-6 sem. | | ↑ Reinervação | | |
| Corrida na roda voluntária | 3, 7 ou 28 dias | Intacto/Ratos | ↓ MAG, ↑PKA ↑ BDNF, GAP-43, CREB. | | GHIANI et al., 2007. GOMEZ-PINILLA et al., 2002 |
| | 3, 7 dias | Esmagamento do nervo isquiático/Ratos | ↑ Regeneração | | MOLTENI et al., 2004. |
| | 17/34 sem. | Lesão da medula espinal/Ratos Congelamento do nervo isquiático/Camundongos | ↑BDNF, NT-3, GAP-43 ↑Degeneração no nervo tibial anterior (2 sem.), ↑ Regeneração no músc. sóleo (8-12 sem.) | | YING et al., 2005. IRINTCHEV; WERNIG (1987) |

Continuação da Tabela 1 - Sumário dos efeitos do exercício físico em modelos animais de lesão em nervos espinais

| Exercício | Duração | Modelo de lesão/ Espécie animal | Regeneração nervosa | Dor Neuropática | Referência |
|-------------------------------|--|--|--|---------------------------|---|
| Corrida na roda voluntária | 8 h/dia, 4 sem. 30 ou 90 dias | Transecção da raiz espinal L4, Transecção da raiz espinal L5/Ratos Transecção do nervo sóleo gastrocnêmio lateral/Ratos | ↑ Contração | | TAM et al.; 2001. SEBURN; GARDINER, 1996 |
| Corrida na esteira | 1 h/dia, 4 sem. 9 h, 1-7 sem. 3 h/dia, 10 sem. 1 h/dia, 1 sem. 1 h/dia, 8 sem. 10 sem. pré- lesão 8 h/dia, 3- 28 dias 1-2 h/dia, 2-6 sem. | Intacto/Ratos Intacto/Camundongos Transecção e reparo do nervo peroneal/Ratos Constricção crônica do nervo isquiático/Camundongos Transecção da raiz espinal L4/Ratos Transecção da raiz espinal L4, Transecção da raiz espinal L5/Ratos Esmagamento do nervo isquiático/Ratos | ↑BDNF, NT-4, TrkB ↑ Brotamento ↑ Mudança no tipo da fibra ↑ Potenciais de ação no nervo ↑ Regeneração | ↓ Alodinia; ↑ Alodinia | SKUP et al., 2002 WERNIG et al., 1991 MARQUESTE et al.; 2004 COBIANCHI et al., 2010 GARDINER et al., 1984. TAM; GORDON, 2003. HERBISON et al., 1980a,b. |

Continuação da Tabela 1 - Sumário dos efeitos do exercício físico em modelos animais de lesão em nervos espinais

| Exercício | Duração | Modelo de lesão/ Espécie animal | Regeneração nervosa | Dor Neuropática | Referência |
|--------------------|--|--|--|---|------------------------------|
| Corrida na esteira | 1 h/dia, 14 dias | Esmagamento do nervo isquiático/Ratos. | ↑ Crescimento do neurito no GRD Proliferação de células de Schwann, ↑GAP-43 | | SEO et al., 2009. |
| | 30 min/dia, 2 sem. Pré e/ou pós lesão. | Esmagamento do nervo isquiático/Camundongos. | ↑ Índice Funcional e Estático do nervo isquiático. | ↓Hiperalgisia mecânica e térmica ao frio. | BOBINSKI et al., 2011b. |
| | 20 min/dia, 2 sem. | Transecção e reparo do nervo isquiático/Camundongos. | ↑Alongamento axonal e brotamento | | SABATIER et al., 2008 |
| | 60 min/dia, 2 sem. | | ↑Alongamento axonal, mas não o brotamento. | | SABATIER et al., 2008 |
| | 1 h/dia, 4 sem. | Transecção e reparo do nervo isquiático/Ratos | ↑Regeneração e reinervação | ↓Excitabilidade de reflexo H | UDINA et al., 2011 |
| | 1 h/dia, 4 sem. | | ↑ Regeneração e reinervação | ↑Recuperação sensorial | ASENSIO-PINILLA et al.; 2009 |

Legenda: Sumário dos efeitos do exercício físico de natação, corrida na roda e corrida na esteira em modelos animais de lesões em nervos espinais. Duração: min: minutos; h: horas; sem: semanas. Outros símbolos: ↑aumento ou melhora; ↓redução. MAG, glicoproteína associada à mielina; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; PKA, proteína cinase A; NT-3, neurotrofina-3; NT-4, neurotrofina-4; GAP-43, proteína associada ao crescimento-43; CREB, elemento de ligação responsivo ao AMP cíclico. GRD, gânglio da raiz dorsal; TrkB, receptor de tropomiosina cinase B; músc., músculo.
Fonte: Adaptado de Udina et al. (2011).

1.10 PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Tem sido sugerido que o exercício físico pode modular a resposta imune em uma variedade de modelos animais e estudos clínicos (KOHUT; BOEHM; MOYNIHAN, 2001; BRUUN et al., 2006; YAKEU et al., 2010). Um estudo clínico com adultos saudáveis que foram submetidos a um programa de exercício de caminhada (10.000 passos/dia, três vezes por semana, durante 8 semanas) demonstrou que o exercício físico moderado está associado tanto com a produção de citocinas derivadas de células Th2, quanto com a ativação de receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma- γ (PPAR γ), e que estes efeitos se correlacionam com a redução da expressão de marcadores de macrófagos M1 e ao aumento da expressão de marcadores de macrófagos M2 em leucócitos de humanos. Neste trabalho, foi observada a sinalização Th2 aumentada pelo exercício físico, especialmente pelo aumento da expressão do RNAm de IL-4 e IL-10 e redução da expressão do RNAm de IL-6, TNF- α e MCP-1 em leucócitos (YAKEU et al., 2010).

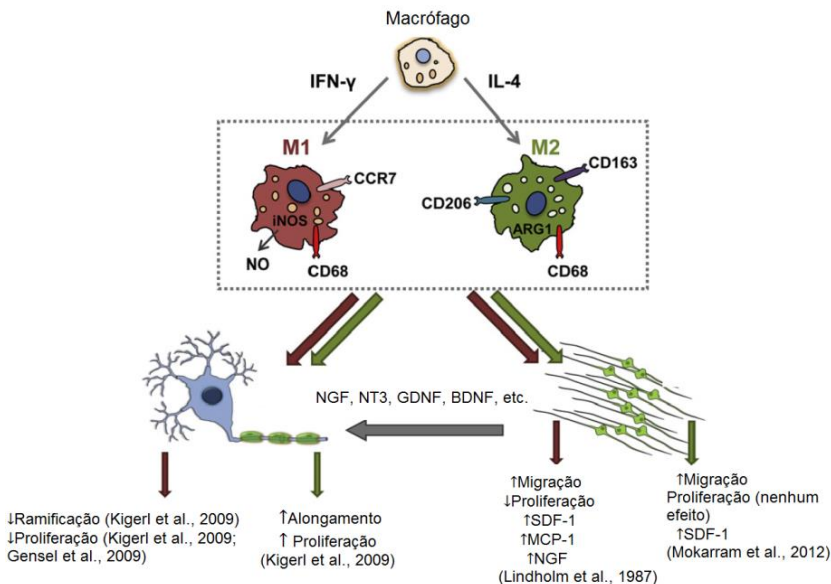
Estes achados estão de acordo com outros trabalhos que demonstram que o exercício moderado aumenta as concentrações de marcadores anti-inflamatórios como a IL-4, enquanto que o exercício intenso reduz a concentração desta interleucina no soro (GIRALDO et al., 2009), além de reduzir a infiltração de macrófagos e a inflamação através da redução do RNAm de IL-6, IL-8 e MCP-1 no plasma e IL-6, IL-8 e TNF- α no tecido adiposo (BRUUN et al., 2006).

A fonte exata de citocinas derivadas da resposta Th2, como a IL-4, IL-13 e IL-10 geradas durante o exercício ainda não é totalmente conhecida, no entanto, está bem caracterizado o papel parácrino destas citocinas em promover a diferenciação de monócitos circulantes em macrófagos com fenótipo M2 no tecido (GORDON, 2007; MANTOVANI et al, 2004). Muitos dos efeitos benéficos do exercício físico envolvem PPAR γ como um coativador em tecidos como o músculo esquelético. O PPAR γ /PGC-1 $_{\alpha/\beta}$ (coativador 1 $_{\alpha/\beta}$ de PPAR γ) induzido pelo exercício físico aumenta a regulação de genes marcadores de macrófagos com fenótipo M2, sugerindo uma via paralela, daquela pela qual a PPAR γ /PGC-1 $_{\alpha}$, exerce seu efeito no músculo esquelético (HANDSCHIN; SPEIGELMAN, 2006; 2008). Estes dados sugerem que esta via pode existir também em células não musculares, como monócitos/macrófagos; mais amplamente, o exercício físico é um

fenômeno sistêmico e seus efeitos não são limitados a um tecido em particular.

De fato, ainda não se conhece o efeito do exercício físico sobre a produção de citocinas derivadas de células Th2 e a indução de fenótipos específicos de macrófagos no nervo isquiático após a lesão por esmagamento. No entanto, um estudo demonstrou que a modulação do fenótipo de macrófagos através de IFN- γ , guiando para o subtipo M1 e de IL-4, guiando para o subtipo M2 pode modular a regeneração nervosa num modelo de transecção do nervo isquiático de ratos. Foi demonstrado que a IL-4 aumenta a proliferação de células de Schwann, o número de axônios e a polarização de macrófagos para o fenótipo M2_{a/c}, enquanto que o IFN- γ guia para o subtipo de macrófagos M1 e promove prejuízos no processo de regeneração do nervo (MOKARRAM et al., 2012) (Figura 6).

Figura 6 - Polarização de macrófagos para o fenótipo M1 ou M2



Legenda: Representação esquemática da polarização de macrófagos para o fenótipo M1 ou M2 afetando indiretamente as células de Schwann e axônios. Após a polarização, os macrófagos pró-inflamatórios (M1) (seta vermelha) e anti-inflamatórios (M2_{a/c}) (seta verde) exercem efeitos diferentes sobre as células de Schwann e axônios, modificando a proliferação e morfologia dos

Continuação da legenda da Figura 6.

axônios, bem como, a proliferação e secreção de neurotrofinas pelas células de Schwann. NGF, fator de crescimento do nervo; NT3, neurotrofina-3; GDNF, fator neurotrófico derivado de células gliais; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo. Símbolos: ↑aumento ou melhora; ↓redução.

Fonte: Adaptado de Mokarram et al. (2012).

De acordo com os dados descritos na literatura e relatados anteriormente, juntamente com os resultados observados em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (BOBINSKI et al., 2011b; MARTINS et al., 2011), sabe-se que a lesão por esmagamento do nervo isquiático promove alterações periféricas (no sítio da lesão) e centrais (no corno dorsal da medula espinal e no tronco encefálico) que resultam de um processo degenerativo do nervo, evidenciado comportamentalmente através da redução da função do nervo isquiático e da presença de hiperalgesia mecânica e térmica crônica. No nervo isquiático ocorre a migração de células do sistema imunológico e a regulação positiva de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β e TNF- α), bem como, a redução de mediadores anti-inflamatórios (IL-4, IL-5, IL-1ra), neurotrofinas (BDNF e NGF), número de axônios mielinizados e de marcadores da mielinização axonal, como a PMP22.

Na medula espinal, a lesão promove aumento de mediadores pró-inflamatórios (BDNF, NGF, IL-1 β e TNF- α), redução de mediadores anti-inflamatórios (IL-4, IL-1ra) e ativação de células gliais (microglia e astrócitos). Além disso, em sítios supraespinais, no tronco encefálico, o esmagamento do nervo isquiático resulta em alterações do sistema monoaminérgico, diminuindo a disponibilidade de monoaminas, alterando a expressão de receptores de 5-HT (5-HT_{1A}R e 5-HT_{3A}R), a densidade dos transportadores de serotonina (SERT) e a concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), facilitando a nocicepção.

1.11 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é de que o exercício físico promoveria o aumento da concentração da IL-4 no local da lesão e, através desta interleucina, a migração de macrófagos do subtipo M2, aumentando liberação de citocinas anti-inflamatórias no nervo lesionado. Da mesma forma, o exercício físico poderia aumentar a concentração de

neurotrofinas no nervo lesionado, promovendo a regeneração e a rápida remielinização do nervo. Além disso, na medula espinal, o exercício físico poderia promover uma maior liberação de citocinas anti-inflamatórias e uma redução de mediadores pró-inflamatórios, prevenindo, desta maneira, a ativação de células gliais. No tronco encefálico, o exercício físico poderia facilitar a neurotransmissão serotoninérgica, aumentando o conteúdo de 5-HT e regulando seus receptores, bem como os SERT, através da redução de citocinas pró-inflamatórias. Juntos, esses mecanismos contribuiriam para a redução da dor neuropática e promoveriam a regeneração do nervo após a lesão.

Desta maneira, o presente estudo utilizou investigações *in vivo*, por meio de ensaios farmacológicos, animais geneticamente modificados e testes comportamentais, bem como investigações *ex vivo*, através de análises bioquímicas, imunológicas, moleculares e imunoistológicas, para elucidar o mecanismo de ação do exercício físico de baixa intensidade na dor neuropática e na regeneração nervosa após a lesão por esmagamento do nervo isquiático em camundongos.

2 JUSTIFICATIVA

Dados estatísticos indicam que a prevalência de dor crônica é estimada entre 20% a 40% da população mundial, sendo ainda mais alarmante o fato de que cerca de 50% a 60% dos acometidos ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida (INSTITUTE OF MEDICINE COMMITTEE ON ADVANCING PAIN RESEARCH AND EDUCATION, 2011). A dor neuropática está entre os mais difíceis tipos de dor crônica para tratar devido a sua complexidade etiológica e o envolvimento de muitos sistemas de neurotransmissores, receptores, canais iônicos e tipos celulares (JAIN, 2008, TRUINI, GARCIA-LARREA, CRUCCU, 2013; UDINA et al., 2011). O manejo farmacológico da dor crônica tem sido um desafio na face clínica (DWORKIN et al., 2007) e, atualmente ainda não dispomos de medicamentos que possam efetivamente aliviar a dor neuropática com a velocidade ou a eficiência necessária para a maioria dos pacientes, sem que, no entanto, causem efeitos colaterais significativos que comprometam a sua utilização (BORSOOK, 2012).

As abordagens não farmacológicas como a estimulação elétrica nervosa transcutânea, a acupuntura, o ultrassom e o exercício físico regular são cada vez mais utilizadas como adjuvantes no tratamento da dor e são efetivas em aliviar a dor crônica, bem como a dor neuropática (HAYDEN, VAN TULDER, TOMLINSON, 2005; NORRBRINK et al., 2012; NIZARD et al., 2012). No entanto, uma importante vantagem da terapia com exercício físico em muitas doenças é o seu efeito sobre vários órgãos e sistemas, de forma simultânea (DISHMAN et al., 2006). Além disso, o exercício físico melhora a qualidade de vida de uma maneira geral, indo contra os efeitos da inatividade física, que hoje é identificada como o quarto principal fator de risco para a mortalidade global (SHARAN et al., 2009). Neste contexto, justifica-se o estudo de terapias que possam complementar o tratamento da dor, de forma segura e eficaz.

Além disso, estudos têm demonstrado que o exercício físico de baixa intensidade pode ser um tratamento adequado após lesões de nervos espinais, pois reduz a hiperalgesia, ao mesmo tempo em que promove a regeneração do nervo e a melhora da função sensorio-motora (COBIANCHI et al., 2010; BOBINSKI et al., 2011b). Portanto, o exercício físico pode ser utilizado como uma terapia complementar no tratamento de lesões traumáticas de nervos espinais e pode ser

facilmente aplicado no sistema público de saúde, por ser uma terapia de baixo custo, reduzindo, desta forma, o impacto socioeconômico e melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, justifica-se o estudo de mecanismos de ação adicionais àqueles já descritos na literatura sobre os efeitos anti-hiperalgésico e neuroregenerativo do exercício físico de baixa intensidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estudar os mecanismos de ação do efeito anti-hiperalgésico e neuroregenerativo do exercício físico de baixa intensidade realizado na esteira, após a lesão por esmagamento do nervo isquiático em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o efeito do exercício físico na hiperalgesia mecânica, no processamento cortical da nocicepção e na locomoção espontânea após a lesão por esmagamento do nervo isquiático.

Investigar o efeito do exercício físico na modulação de citocinas pró- (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-1ra) após a lesão por esmagamento do nervo isquiático, no local da lesão, na medula espinal e no tronco encefálico.

Investigar o papel da IL-4 no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico e na migração e fenótipo de macrófagos no local da lesão por esmagamento do nervo isquiático.

Investigar o efeito do exercício físico na modulação de neurotrofinas (β -NGF e BDNF) após a lesão por esmagamento do nervo isquiático, no local da lesão e na medula espinal.

Investigar o efeito do exercício físico na ativação de células gliais (astrócito e microglia) após a lesão por esmagamento do nervo isquiático, no corno dorsal da medula espinal.

Investigar o efeito do exercício físico nos níveis da proteína da mielina PMP22, no local da lesão por esmagamento do nervo isquiático.

Investigar a participação das monoaminas (5-HT e catecolaminas) endógenas no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, após a lesão por esmagamento do nervo isquiático.

Avaliar as concentrações de 5-HT, NA, DA e seus metabólitos após a lesão por esmagamento do nervo isquiático, na medula espinal e no tronco encefálico.

Investigar o efeito do exercício físico na modulação de componentes do sistema serotoninérgico do tronco encefálico (enzimas Tph2 e Dbh, SERT e dos receptores de 5-HT [5-HT_{1A}R, 5-HT_{1B}R, 5-

HT_{2A}R, 5-HT_{2C}R, 5-HT_{3A}R e 5-HT₇R]), após a lesão por esmagamento do nervo isquiático.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1.1 Parte I – Papel das interações neuroimunes no efeito anti-hiperalgésico e neuroregenerativo do exercício físico após a lesão do nervo isquiático

Experimento 1) O primeiro experimento avaliou os efeitos do exercício físico em camundongos Swiss sujeitos a lesão do nervo isquiático. Os seguintes grupos foram comparados: i) Sham (n= 8), ii) Sedentário (n= 8) e iii) Exercitados (n= 8). Foram realizados os testes comportamentais de von Frey e paradigma fuga/esquiva, de acordo com os itens 4.5.1 e 4.5.2, respectivamente, antes da lesão no nervo e 24 horas após o tratamento com o exercício físico do 3º ao 14º dia após a lesão no nervo. Além disso, ao final do programa de tratamento com exercício físico, no dia 15 após a lesão, foi realizado o teste do campo aberto, de acordo com o item 4.5.3.

Experimento 2) A fim de avaliar a participação da migração de células do sistema imunológico para o local da lesão no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, foi realizado o pré-tratamento dos animais com fucoidina ou veículo, de acordo com o descrito no item 4.6.1, e a hiperalgesia mecânica, de acordo com o item 4.5.1, foi testada antes da lesão no nervo (Basal) e do dia 5 ao dia 14, sendo que no dia 7, foram realizadas avaliações do decurso temporal para se observar a duração do efeito da fucoidina nos animais exercitados ou sedentários. Foram utilizados os seguintes grupos de camundongos Swiss: i) Salina/Sham (n=6), ii) Salina/Sedentário (n=6), iii) Salina/Exercitado (n=8), iv) Fucoidina/Exercitado (n=8) e v) Fucoidina/Sedentário (n=7).

Experimento 3) No mesmo grupo de animais do Experimento 1, após serem eutanasiados, as concentrações das citocinas pró- e anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-6 e IL-1ra e das neurotrofinas: β -NGF e BDNF no nervo isquiático e medula espinal foram quantificadas por meio de ELISA, de acordo com o item 4.7.1.

Experimento 4) Considerando que se observou que as concentrações de IL-4 estavam aumentadas no nervo isquiático e medula espinal de animais exercitados, investigou-se se a remoção da IL-4, através do uso de animais *knockouts* para a IL-4, poderia prevenir o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico. Como os animais

knockouts para a IL-4 eram congênicos com a linhagem de camundongos selvagens BALB/cJ, primariamente confirmou-se o efeito do exercício físico em camundongos BALB/cJ WT. O experimento final comparou os seguintes grupos de camundongos BALB/cJ: i) WT Sham (n= 5); ii) WT Sedentário (n= 5); iii) WT Exercitados (n= 5); iv) IL-4^{-/-} Exercitados (n= 6) and v) IL-4^{-/-} Sedentários (n= 6). Os testes comportamentais de von Frey foram realizados, de acordo com o item 4.5.1, antes da lesão no nervo e 24 horas após o tratamento com o exercício físico do 3º ao 14º dia após a lesão.

Experimento 5) Para avaliar o número total e o fenótipo de macrófagos no nervo isquiático após duas semanas de tratamento com exercício físico, nos mesmos grupos descritos no Experimento 4, as amostras do nervo isquiático foram coletadas e processadas para imunistoquímica, de acordo com o item 4.8.1, e imunomarcadas para macrófagos do tipo M1 e M2_{a/c}.

Experimento 6) Considerando o aumento das concentrações de neurotrofinas no nervo isquiático após duas semanas de tratamento com exercício físico, em outra série de experimentos nos mesmos grupos de animais descritos no Experimento 1 (n= 5), após a eutanásia, foram coletadas amostras do nervo isquiático (direito) para a realização de Western Blotting, de acordo com o item 4.7.3, para a avaliação da proteína da mielina PMP22, relacionada ao processo de regeneração do nervo após a lesão.

Experimento 7) Para a avaliação dos eventos que ocorrem no processo de degeneração Walleriana distal, em outra série de experimentos nos mesmos grupos de animais descritos no Experimento 1 (n= 3), após a eutanásia, as amostras do nervo isquiático foram coletadas e processadas para histologia por microscopia eletrônica, de acordo com o item 4.9.1.

Experimento 8) Para avaliar a ativação glial no corno dorsal da medula espinal, após duas semanas de tratamento com exercício físico, em outra série de experimentos, camundongos Swiss dos mesmos grupos descritos no Experimento 1 (n= 4-6) foram eutanasiados e parte da medula espinal (L3-L6) foi removida e processada para imunistoquímica, de acordo com o item 4.8.3, para a imunomarcagem de GFAP (astrócitos) e Iba1 (microglia).

Todo o protocolo experimental da parte I está representado de uma forma esquemática e temporal na Figura 7.

Continuação da legenda da Figura 7.

No 15º dia após a lesão, depois de duas semanas de exercício físico, os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto (CA) e, posteriormente, foram eutanasiados e tiveram os tecidos (nervo isquiático e medula espinal) coletados para as análises por ELISA, WT (Western Blotting), IH (imunoistoquímica) e HIST (histologia por microscopia eletrônica). Em outra série de experimentos, o tratamento dos camundongos com fucoidina (10 mg/kg, i.p.) foi realizado diariamente antes do exercício físico e a hiperalgesia mecânica foi testada nos dias -1, 5, 7 (realizado o decurso temporal em 1, 2, 4, 6 e 24 horas), 12 e 14.

Fonte: A autora (2015).

4.1.2 Parte II - Papel das monoaminas no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico após a lesão do nervo isquiático

Experimento 1) Para avaliar a participação da 5-HT endógena no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, os camundongos foram pré-tratados com PCPA ou veículo, de acordo com o descrito no item 4.5.2 e a hiperalgesia mecânica, de acordo com o item 4.5.1, foi avaliada antes da lesão no nervo e 24 horas após o tratamento com o exercício físico nos dias 5, 7 e 14 após a lesão. Os seguintes grupos de camundongos Swiss foram comparados: i) Salina/Sham (n=8), ii) Salina/Sedentário (n=8), iii) Salina/Exercitado (n=8), iv) PCPA/Exercitado (n=8) e v) PCPA/Sedentário (n=8).

Experimento 2) A fim de avaliar a participação das catecolaminas endógenas no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, no 7º dia após a lesão os camundongos foram pré-tratados com AMPT ou veículo, de acordo com o descrito no item 4.6.3, e a hiperalgesia mecânica, de acordo com o item 4.5.1, foi mensurada 0,5, 1, 2 e 24 horas após a sessão de exercício físico. Os seguintes grupos de camundongos Swiss foram comparados: i) Salina/Sham (n=7), ii) Salina/Sedentário (n=8), iii) Salina/Exercitado (n=8), iv) AMPT/Exercitado (n=8) e v) AMPT/Sedentário (n=6).

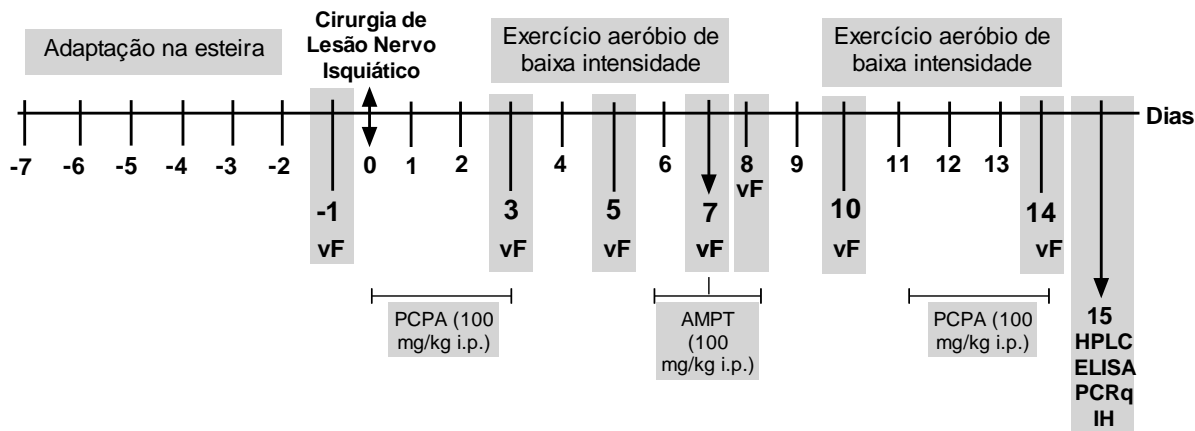
Experimento 3) Os animais do Experimento 1 e 2 foram eutanasiados, tiveram o tronco encefálico dissecados e o conteúdo de 5-HT, 5-HIAA, NA, DHPG, DA, DOPAC e HVA foram quantificado por HPLC-ED, de acordo com o descrito no item 4.7.2.

Experimento 4) Desde que o PCPA bloqueou o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, e o conteúdo de 5-HT e 5-HIAA estavam aumentados no tronco encefálico, investigamos se a lesão do nervo isquiático ou o exercício físico poderiam modificar outros aspectos do sistema serotoninérgico como a densidade dos SERT, de acordo com o item 4.8.2, através de imunistoquímica. Em uma série separada de experimentos, os seguintes grupos de camundongos Swiss foram comparados: i) Sham (n= 4), ii) Sedentário (n= 5) e iii) Exercitados (n= 5).

Experimento 5) Em uma série separada de experimentos, avaliamos também através de PCRq, de acordo com o item 4.7.4, o RNAm dos SERT no tronco encefálico, a fim de estender os dados obtidos na técnica de imunistoquímica. Além disso, através da técnica de PCRq avaliamos a expressão do RNAm de receptores de 5-HT (5-HT_{1A}R e 1_B, 5-HT_{2A}R e 2_C, 5-HT_{3A}R, 5-HT₇R) e de enzimas envolvidas na síntese de 5-HT (Tph2) e de NA (Dbh) no tronco encefálico. Nesta série de experimentos, os seguintes grupos de camundongos Swiss foram comparados: i) Sham, ii) Sedentário e iii) Exercitados (n= 5 por grupo).

Experimento 6) Visto que a densidade e RNAm dos SERT estavam reduzidas quando os animais foram tratados com exercício físico após a lesão do nervo isquiático, estudamos um dos possíveis mecanismos pelo qual o exercício reduz os SERT. Para isso, avaliamos através da técnica de ELISA, de acordo com o item 4.7.1., as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no tronco encefálico de camundongos Swiss dos seguintes grupos experimentais: i) Sham, ii) Sedentário e iii) Exercitados (n= 6-8 por grupo). Todo o protocolo experimental da parte II está representado de uma forma esquemática e temporal na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática e temporal do protocolo experimental da parte II



Legenda: Os dias -7 a -1 indicam o tempo antes da cirurgia de esmagamento do nervo isquiático. A adaptação na esteira foi realizada dos dias -7 a -2. O dia 0 indica o dia da cirurgia de esmagamento do nervo isquiático. O tratamento com exercício físico foi realizado dos dias 3 a 7 e dos dias 10 a 14. Os testes de von Frey (vF) foram realizados nos dias -1, 3, 5, 7, 10 e 14. O tratamento dos camundongos com PCPA (100 mg/kg, i.p.) foi realizado dos dias 0 a 3 e novamente dos dias 11 a 14 após a lesão, neste período a hiperalgesia mecânica foi avaliada nos dias -1, 5, 7 e 14. O tratamento com AMPT (100 mg/kg, i.p.) foi realizado no dia 7; 3,5 horas antes do tratamento com exercício físico e, posteriormente, foi realizado o decurso temporal da hiperalgesia mecânica, com avaliações durante o dia 7 e 8. No 15º dia após a lesão os animais foram eutanasiados e os tecidos (medula espinal e tronco encefálico) foram coletados para as análises por HPLC, ELISA, PCRq e IH (imunoistoquímica).

Fonte: A autora (2015).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 229 camundongos (*Mus musculus*) Swiss (30 a 40 g, 8 a 10 semanas) machos fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil). Também foram utilizados 15 camundongos BALB/cJ (20 a 30 g, 8 a 10 semanas) do tipo selvagens (do inglês, *wild-type* [WT]) e 12 camundongos *knockouts* para o alelo $c\text{-IL4}^{\text{tm}2\text{Nnt}}$, que codifica a interleucina anti-inflamatória IL-4 ($\text{IL-4}^{-/-}$), fornecidos pela *Jackson Laboratory* para a *University of Iowa* (Iowa City, IA, EUA), onde tais experimentos foram realizados. Os camundongos foram mantidos em câmaras isoladas contendo no máximo 6 animais por caixa, com ventilação, sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (60% - 80%) em ciclos de 12 horas claro-escuro (6 às 18 horas), além de livre acesso a água e ração.

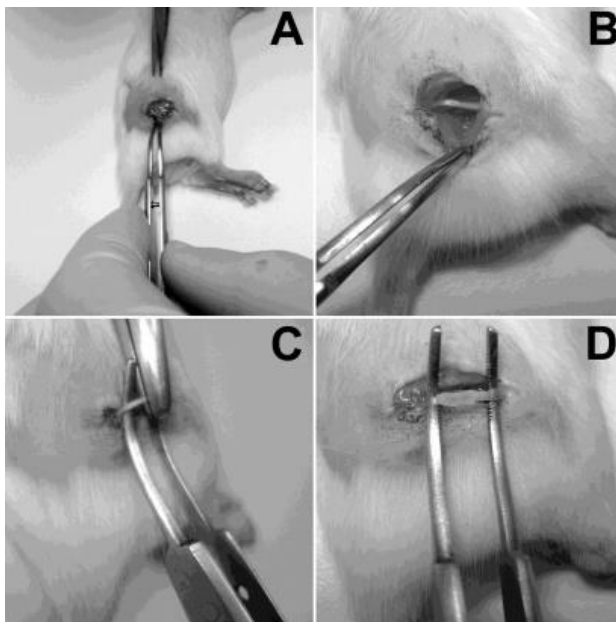
Para os estudos comportamentais, os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. Estes foram conduzidos de acordo com as orientações e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983). Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolos PP0681 e PP00745) ou pelo *University of Iowa Animal Care and Use Committee* (protocolo 11102229).

Os seguintes grupos experimentais de animais Swiss e BALB/cJ selvagens (WT) foram utilizados: i) Sham: animais submetidos a um falso procedimento cirúrgico, com abertura da pele e divulsão dos músculos da coxa, sem lesão do nervo (usados como controle da cirurgia); ii) Sedentário: animais que foram submetidos à cirurgia de esmagamento do nervo e não realizaram exercício físico; iii) Exercitado: animais que realizaram o programa de exercício físico por duas semanas após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo. Foram utilizados também os seguintes grupos de animais *knockouts* para IL-4 ($\text{IL-4}^{-/-}$): iv) $\text{IL-4}^{-/-}$ Sedentário: animais que foram submetidos à cirurgia de esmagamento do nervo e não realizaram exercício físico; v) $\text{IL-4}^{-/-}$ Exercitado: animais que realizaram o programa de exercício físico por duas semanas após serem submetidos ao procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo.

4.3 LESÃO POR ESMAGAMENTO DO NERVO ISQUIÁTICO

Os animais foram previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal contendo xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg). Após a verificação da perda de consciência do animal (através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), efetuou-se a tricotomia da área operada. Em seguida, foi realizada uma incisão curvilínea na coxa direita do animal, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminando próximo à fossa poplítea, ao nível da inserção dos músculos ísquiotibiais. A exposição do nervo isquiático foi conseguida após a divulsão dos músculos semitendinoso e reto femoral. Com o auxílio de uma pinça hemostática não serrilhada, realizou-se o esmagamento do nervo isquiático direito por 30 segundos, a aproximadamente 10 mm acima da trifurcação do nervo (adaptado para camundongos de BRIDGE et al., 1994). Logo após, a divulsão muscular e a pele foram reparadas por dois pontos de sutura com fio absorvível (Ethicon, 4-0) e realizada a assepsia no local com antisséptico Iodopovidona (Povidine®) (Figura 9). Após a cirurgia, os animais permaneceram próximos a uma fonte de calor até retornarem a deambular pela caixa, voltando então ao biotério do respectivo laboratório.

Figura 9 - Lesão por esmagamento do nervo isquiático em camundongos



Legenda: Fotografias da cirurgia de esmagamento do nervo isquiático em camundongos. (A) Incisão cirúrgica; (B) exposição do nervo isquiático; (C) esmagamento do nervo com a pinça hemostática não serrilhada por 30 segundos; (D) nervo após o esmagamento.

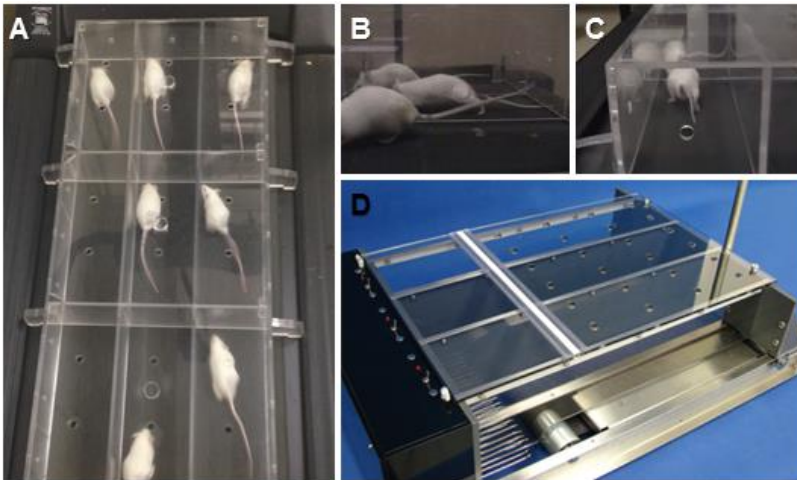
Fonte: Adaptado de Cidral-Filho, (2013).

4.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO DE BAIXA INTENSIDADE

Os animais foram habituados na esteira durante seis dias antes da realização da lesão do nervo, 5 min por dia, a uma velocidade de 10 m/min, a fim de minimizar o estresse causado pelo ambiente diferente. O programa de treinamento realizado no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (UFSC) foi realizado em esteira ergométrica (Advanced 2, Athletic, Joinville, SC, Brasil) adaptada para camundongos, com 12 raias individuais (25 x 10 x 9,5 cm) de acrílico (Figura 10). Os programas de exercícios realizados no *Neurobiology of Pain Laboratory* (University of Iowa) utilizaram-se de uma esteira

específica para o uso com animais (Treadmill Exer 3/6, Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA), com 6 raias individuais (43,8 x 6 x 12,7 cm) de acrílico (Figura 10). O programa de exercício físico utilizado foi adaptado de Sabatier et al. (2008) e consiste de corrida durante 30 minutos por dia a uma velocidade de 10 m/min, sem inclinação, cinco dias por semana, por duas semanas. Nosso estudo prévio determinou a intensidade deste protocolo, através da análise da concentração de lactato sanguíneo. O teste constatou que este programa de exercício físico é aeróbio de baixa intensidade, realizado a 75% da carga da máxima fase estável do lactato (BOBINSKI et al., 2011b). O tratamento com exercício físico teve início no terceiro dia após a lesão no nervo. Os animais dos grupos não exercitados (Sham e Sedentário) foram apenas manipulados e colocados na esteira (sem movimento), pelo mesmo tempo, a fim de serem submetidos aos mesmos procedimentos operacionais.

Figura 10 – Esteiras utilizadas para a realização do exercício físico de corrida



Legenda: Fotografias da esteira ergométrica Advanced 2 (Athletic, Joinville, SC, Brasil) adaptada para camundongos (A, B e C) e esteira Treadmill Exer 3/6 (D) (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA), utilizadas para a prática do programa de exercício físico (corrida) neste estudo.

Fonte: Adaptado de Bobinski (2011a).

4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.5.1 Teste de von Frey

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando o teste com monofilamento de von Frey (0,4 g) (VFH, Stoelting, Chicago, IL, EUA). Foi observada a frequência de resposta de retirada da pata estimulada, frente a um estímulo mecânico como descrito previamente por Bobinski et al. (2011b). Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo, posicionada sobre uma plataforma com malha de arame, para permitir o acesso à superfície plantar da pata dos animais. O teste consistiu na aplicação do filamento de von Frey (durante 5 segundos) na pata posterior direita, atendendo alguns critérios: i) a aplicação foi feita perpendicularmente à superfície plantar; ii) a pressão foi suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; iii) os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela de apoio e iv) a resposta de retirada da pata foi considerada positiva quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio. O resultado deste teste foi expresso em porcentagem de resposta frente a 10 aplicações do estímulo. O teste de von Frey foi realizado para avaliar a hiperalgesia mecânica em camundongos Swiss, BALB/cJ WT e BALB/cJ IL-4^{-/-}, distribuídos de acordo com cada protocolo experimental.

4.5.2 Teste do paradigma fuga/esquiva

Para avaliar o processamento supraespinal da nocicepção utilizou-se o teste do paradigma fuga/esquiva, como descrito previamente em camundongos (PRATT; FUCHS; SLUKA, 2013). Uma caixa de acrílico (16 cm x 7 cm x 13 cm) foi colocada na parte superior de uma tela de malha de arame, similar a usada no teste de von Frey. A metade direita da caixa era branca e preta, com linhas verticais, enquanto a outra metade era somente branca. Durante a realização dos testes foi permitido aos camundongos moverem-se sem restrições para ambos os lados da caixa, por um período de 30 minutos. Durante este período realizou-se a estimulação mecânica na superfície plantar da pata posterior direita ou esquerda, com o filamento de von Frey de 0,07 g (1 vez por segundo, durante 30 minutos). A pata direita (ipsilateral à lesão) foi estimulada quando o animal estava na metade da caixa branca e

preta, com linhas verticais, e a pata esquerda (contralateral à lesão) foi estimulada quando o animal estava do lado esquerdo da caixa (lado branco). O tempo em que os animais passaram em cada lado da caixa foi calculado e o gráfico foi expresso com a porcentagem do tempo, em 30 minutos, em que os animais permaneceram no lado direito da caixa. O teste do paradigma fuga/esquiva foi realizado para avaliar o processamento supraespinhal da nocicepção em camundongos Swiss, distribuídos de acordo com cada protocolo experimental.

4.5.3 Teste do campo aberto

A fim de relacionar a atividade locomotora espontânea dos animais ao comportamento de dor, a deambulação foi avaliada pelo teste do campo aberto. O aparato consistiu em uma arena circular de madeira com 62 cm de diâmetro x 29,5 cm de altura, pintada inteiramente de branco (campo aberto). O assoalho desta arena é dividido por meio de três círculos concêntricos subdivididos através de segmentos de retas em dezenove partes de tamanho semelhante, de acordo com Eysenck (1960).

No 15º dia após a lesão do nervo isquiático, decorridos 24 horas da última sessão de exercício físico, os animais foram colocados individualmente no centro da arena, permitindo que explorassem livremente o aparato por um período de 6 min. No decorrer deste período foi avaliado o número de unidades de locomoção percorridas. Cada unidade de locomoção correspondeu ao ato do animal entrar com as quatro patas nas divisões marcadas no fundo da arena. A soma destas unidades foi registrada e expressa como número de cruzamentos. Entre as observações de cada animal, o aparato foi limpo com solução etanólica a 20%.

4.6 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*

4.6.1 Participação de leucócitos no efeito do exercício físico

A fim de avaliar a participação das células do sistema imunológico que infiltram o local da lesão em resposta à realização de um programa de exercício físico, realizou-se o pré-tratamento dos animais com fucoidina (10 mg/kg, via intraperitoneal [i.p.]) ou com veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg, i.p.), 20 minutos antes do tratamento

com o exercício físico, diariamente. A fucoidina é um potente inibidor das selectinas P e L, a qual bloqueia o rolamento dos leucócitos, levando a uma redução no acúmulo destas células no sítio inflamatório (STEIN, 1995). Foram utilizados os seguintes grupos de camundongos Swiss: i) Salina/Sham (n=6), ii) Salina/Sedentário (n=6), iii) Salina/Exercitado (n=8), iv) Fucoidina/Exercitado (n=8) e v) Fucoidina/Sedentário (n=7). Os efeitos dos tratamentos foram observados através do teste de hiperalgesia mecânica com o filamento de von Frey, como descrito no item 3.4.1. O teste foi realizado antes de qualquer procedimento, para demonstrar os valores basais (Basal) e no 5º, 7º, 12º e 14º dia após a lesão no nervo, sendo que no 7º dia foi realizada uma avaliação do decurso temporal para observar a duração do efeito da fucoidina.

4.6.2 Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do exercício físico

Visando avaliar a possível participação da 5-HT endógena no efeito anti-hiperalgésico induzido pelo exercício físico, os animais foram pré-tratados com ρ -clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA) ou com veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg, i.p.). O PCPA é um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, a enzima limitante na biossíntese de 5-HT, o que resulta em inibição da síntese e redução funcional das concentrações desta monoamina (aproximadamente 78%) no SNC (O'LEARY et al., 2007; FAJEMIROYE et al., 2013). O PCPA ou salina foram administrados uma vez por dia por 4 dias consecutivos, imediatamente antes do início do programa de tratamento com exercício físico, e, novamente, entre os dias 11 e 14 após a lesão do nervo. A hiperalgesia mecânica foi mensurada como descrita no item 4.5.1, 24 horas após o programa de exercício físico nos dias 5, 7 e 14 após a lesão no nervo. Para este experimento os seguintes grupos de camundongos Swiss foram utilizados: i) Salina/Sham (n=8), ii) Salina/Sedentário (n=8), iii) Salina/Exercitado (n=8), iv) PCPA/Exercitado (n=8) e v) PCPA/Sedentário (n=8).

4.6.3 Envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito do exercício físico

Visando avaliar a possível participação das catecolaminas endógenas no efeito anti-hiperalgésico induzido pelo exercício físico, os

animais foram pré-tratados com α -metil-para-tirosina (AMPT, 100 mg/kg, i.p., Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA) ou com veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg, i.p.). O AMPT é um inibidor da enzima tirosina hidroxilase (Th), a enzima limitante na biossíntese de catecolaminas, o que resulta em uma redução funcional das concentrações de NA (aproximadamente 61%) e DA (aproximadamente 67%) no SNC (O'LEARY et al., 2007; FAJEMIROYE et al., 2013). O tratamento com este inibidor foi realizado no 7º dia após a lesão do nervo, período em que a dor neuropática já está bem estabelecida e que o efeito do exercício físico é bastante proeminente. Decorridas 3,5 horas da administração do AMPT ou salina, foi realizada uma sessão de exercício físico e posteriormente, avaliada a hiperalgesia mecânica, como descrito no item 4.5.1, em 0,5, 1, 2 e 24 horas após a sessão de exercício físico. Para este experimento os seguintes grupos de camundongos Swiss foram utilizados: i) Salina/Sham (n=7), ii) Salina/Sedentário (n=8), iii) Salina/Exercitado (n=8), iv) AMPT/Exercitado (n=8) e v) AMPT/Sedentário (n=6).

4.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E IMUNOLÓGICOS

No 15º dia após a lesão do nervo isquiático, decorridas 24 horas após a última sessão de exercício físico, os camundongos Swiss foram anestesiados com isoflurano (2-3% a 100% de oxigênio) e eutanasiados por decapitação para retirada do nervo isquiático, da porção lombar da medula espinal (L3-L6) e do tronco encefálico, para a realização dos ensaios descritos a seguir.

4.7.1 Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima

Para a análise de citocinas e fatores neurotróficos foram dissecadas amostras do nervo isquiático, da porção lombar da medula espinal (L4-L6) e do tronco encefálico de camundongos dos seguintes grupos: i) Sham, ii) Sedentário e iii) Exercitado (n= 5-8 por grupo). Após a dissecação, as amostras foram colocadas em tampão fosfato (PBS) contendo: Tween[®] 20 (0,05%), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) (0,1 mM), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) (10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzametônio (0,1 mM) para a homogeneização. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6900 × g por 10 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi coletado e estocado

a -80°C, para a futura análise. O conteúdo proteico total do sobrenadante foi mensurado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando uma curva padrão de calibração com albumina de soro bovino (BSA) (0,05 a 0,5 mg/mL). Alíquotas de 100 µL foram utilizadas para mensurar as concentrações das citocinas: IL-4 (DY404), IL-5 (DY405), IL-6 (DY406), IL-1ra (DY480) e das neurotrofinas: β-NGF (DY556) e BDNF (DY248) no nervo isquiático e medula espinal, e também foram quantificadas as citocinas: TNF-α (DY410) e IL-1β (DY401) no tronco encefálico; através de kits de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) DuoSet para camundongos (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com instruções do fabricante. As concentrações das citocinas e fatores neurotróficos foram mensurados pela interpolação de uma curva padrão de 7 pontos, por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) em um leitor de placas (Berthold Technologies, Apollo 8 – LB 912, KG, Alemanha) e os valores finais foram expressos como pg/mg de proteína.

4.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico

Para as análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico (CLAE-DE, do inglês: *High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection*, HPLC-ED) foram utilizados camundongos dos grupos testados farmacologicamente para o envolvimento do sistema serotoninérgico: i) Salina/Sham, ii) Salina/Sedentário, iii) Salina/Exercitado, iv) PCPA/Exercitado e v) PCPA/Sedentário (n=8 por grupo); e para o envolvimento do sistema catecolaminérgico: i) Salina/Sham, ii) Salina/Sedentário, iii) Salina/Exercitado, iv) AMPT/Exercitado e v) AMPT/Sedentário (n=6-8 por grupo). As amostras do tronco encefálico e da medula espinal dissecadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C até a preparação. As amostras foram fragmentadas com o uso de sonda de ultrassom a 4°C com ácido hipercloreto 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante e padrão interno. Após a centrifugação a 10000 × g por 30 minutos (4°C) foi retirado o sobrenadante e o conteúdo proteico foi mensurado pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de calibração com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL).

Do sobrenadante, 20 µL foram injetados em uma estação de HPLC composta por uma bomba LC-20AT (Shimadzu Corporation,

Japão), um detector eletroquímico (ESA Coulochem III Electrochemical Detector, Shimadzu) equipado com uma célula-guarda (ESA 5020) com um potencial de 350 mV e uma célula analítica com potências de oxidação de 100 mV para o primeiro eletrodo e 450 mV para o segundo eletrodo. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Synergi Fusion RP C-18 (Phenomenex, Torrance, CA, EUA), com dimensões de 150 x 3,0 mm, partículas de 4 µm, em temperatura de 25 °C, equipada com uma pré-coluna com dimensões de 4,0 x 3,0 mm (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP). Os cromatogramas da 5-HT e seu metabólito, o 5-HIAA; NA e seu metabólito 3,5-hidroxifenilglicina (DHPG); assim como da DA e de seus metabólitos, ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) foram integrados e analisados pelo software LC Solutions (Shimadzu). A fase móvel utilizada na análise das aminas biogênicas foi constituída em solução aquosa (900 mL água MilliQ) com: 20 g de ácido cítrico monoidratado, 40 mg de EDTA, 200 mg de ácido octanossulfônico, 10% de metanol (v/v), pH ajustado em 4,0 e filtrado em filtro de 0,45 µm; a taxa de fluxo utilizada foi de 1 mL/min. As áreas dos picos das amostras foram comparadas às áreas dos padrões externos dos mesmos neurotransmissores e metabólitos (Sigma-Aldrich, MO, EUA), para sua identificação e quantificação. Os resultados foram expressos como ng das aminas analisadas por g de proteína. As taxas de *turnover* das monoaminas foram calculadas pela razão do seu metabólito (ou a soma dos metabólitos) pela monoamina.

4.7.3 Western Blotting

A análise por Western Blotting para a quantificação da expressão da proteína da mielina periférica 22 (PMP 22) foi realizada em amostras do nervo isquiático de camundongos dos seguintes grupos: i) Sham, ii) Sedentário e iii) Exercitado (n= 5 por grupo). Após a dissecação, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80°C. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em solução de lise celular (Cell Signaling, MA, EUA) com 0,1 mM de PMSF em ultraturrax (IKA®; Campinas, SP, Brasil) (4 °C), por 3 séries de 15 segundos cada. Após centrifugação a 14000 rpm por 45 minutos (4°C) o sobrenadante foi recolhido, separado e armazenado em freezer -80 °C (extrato citosólico). O precipitado foi lavado duas vezes em PBS, ressuspenso e homogeneizado novamente em tampão de lise com acréscimo de 1% de triton X-100, centrifugadas

a 14000 rpm por 45 minutos (4°C) e recolhido o sobrenadante (extrato membranar). O conteúdo proteico desta fração foi mensurado pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de calibração com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL). Aliquotas de proteína total (40 µg) foram fervidas a 100°C por 4 minutos em 25% do volume em tampão Laemmli (fosfato de sódio 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol).

As amostras foram submetidas à eletroforese (Mini Protean II - Bio-Rad) em gel de poliacrilamida a 15%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Santa Cruz Biotechnology) na presença de 20% de metanol e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em voltagem constante de 120 V por 2 h. Depois de duas horas de bloqueio com 5% de leite desnatado (Molico) as membranas foram incubadas *overnight* (4°C) com os anticorpos primários: policlonal Rabbit anti-PMP22 (ab61220, Abcam, 1:1000) ou Rabbit anti-β-actina (Santa Cruz Biotechnology, 1:500). Depois de lavadas em tampão salina tris com Tween[®] 20 (TBS-T) (137 mM NaCl e 20 mM Tris HCl + 0,1% Tween[®] 20, pH 7,6) as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase em temperatura ambiente. A detecção foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o kit ECL[™] (Amersham Biosciences, UK) e o imunocomplexo foi visualizado pelo sistema de detecção de quimioluminescência (Amersham). A densidade óptica das bandas específicas foi quantificada pelo sistema de análise de imagens “Image J” (do *National Institutes of Health*, NIH).

4.7.4 PCR Quantitativo em Tempo Real

A análise da expressão gênica para os componentes do sistema serotoninérgico foi realizada como descrito anteriormente por Martins-Silva e colaboradores (2011). Em uma série separada de experimentos, foram utilizados camundongos dos grupos: i) Sham, ii) Sedentário e iii) Exercitado (n= 5 por grupo). As amostras de tronco encefálico dissecadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80°C até a extração do DNA. O RNA total foi extraído usando Reagente de Isolamento de RNA (TRI, Sigma-Aldrich, MO, EUA). O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado utilizando o kit de síntese de DNAc (iScript, BioRad, CA, EUA). Subsequentemente, o PCR quantitativo (PCRq) foi realizado utilizando o CFX96 PCR em tempo real (BioRad, CA, EUA) e o iQ SYBR Green Supermix (BioRad,

CA, EUA). A quantificação relativa da expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando a expressão do gene da β -actina para normalizar os dados. Os genes escolhidos para a análise do RNA mensageiro, suas respectivas referências no NCBI (National Center for Biotechnology Information), *primers*, tamanho do fragmento e referências estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Genes para a análise por PCR quantitativo em tempo real e suas respectivas referências no NCBI, *primers*, tamanho do fragmento e referências

| Gene | Referência no NCBI | Par da sequência de <i>primers</i> 5'-3' | Tamanho do fragmento | Referência |
|-----------------------------|--------------------|--|----------------------|--|
| Receptor 5-HT _{1A} | NM_008308 | GGATGTTTTCTGTCCTGGT/ CACAAGGCCTTTCCAGAACT | 121bp | Bibancos et al., 2007. |
| Receptor 5-HT _{1B} | NM_010482 | TCACATGGCCATTTTTGACT/ CAGTTTGTGGAACGCTTGTT | 112bp | Bibancos et al., 2007. |
| Receptor 5-HT _{2A} | NM_172812 | AGAACCCCATTCACCATAGC/ ATCCTGTAGCCCGAAGACTG | 119bp | Bibancos et al., 2007. |
| Receptor 5-HT _{2C} | NM_008312 | AGCAGTGCGTAGTCCTGTTG/ CTTTCGTCCCTCAGTCCAAT | 132bp | Bibancos et al., 2007. |
| Receptor 5-HT _{3A} | NM_013561 | CTTCCCTTTGATGTGCAG/ CCACTCGCCCTGATTTATG | 139bp | Bibancos et al., 2007. |
| Receptor 5-HT ₇ | NM_008315 | TTCTGCAACGTCTTCATCG/ ATTCTGCCTCACGGGGTA | 126bp | Bibancos et al., 2007. |
| Transportador de 5-HT | NM_010484 | TGCAGATCCATCAGTCAAAGG/ AATGTAAGGGAAGGTGGCTG | 161bp | PrimerQuest® program, IDT, Coralville, USA. Retrieved 12 December, 2012. http://www.idtdna.com/Scitools . |

Fonte: O autor (2015).

Continuação Tabela 2– Genes para a análise por PCR quantitativo em tempo real e suas respectivas referências no NCBI, *primers*, tamanho do fragmento e referências

| Gene | Referência no NCBI | Par da sequência de <i>primers</i> 5'-3' | Tamanho do fragmento | Referência |
|---------------------------|--------------------|---|----------------------|--|
| Transportador de 5-HT | NM_010484 | TGCAGATCCATCAGTCAAAGG/ AATGTAAGGGAAGGTGGCTG | 161bp | PrimerQuest® program, IDT, Coralville, USA. Retrieved 12 December, 2012. http://www.idtdna.com/Scitools . |
| Triptofano hidroxilase 2 | NM_173391 | GGAAGTATTTTGTGGATGTGGC/ AGTCGGGTAGAGTTTGGAGAG | 128bp | PrimerQuest® program, IDT, Coralville, USA. Retrieved 12 December, 2012. http://www.idtdna.com/Scitools . |
| Dopamina beta hidroxilase | NM_138942 | GATTCCCAGCAAGACTACCAG/ CTTCCAAGATCCCATACTAGATG | 148bp | PrimerQuest® program, IDT, Coralville, USA. Retrieved 12 December, 2012. http://www.idtdna.com/Scitools . |
| β-Actina | NM_007393.3 | TGGAATCCTGTGGCATCCATGA/ AATGCCTGGGTACATGGTGTA | 122bp | Martins-Silva et al., 2011 |

Fonte: O autor (2015).

4.8 ENSAIOS DE IMUNOISTOQUÍMICA

No 15º dia após a lesão do nervo, 24 horas após a última sessão de exercício físico, os animais foram anestesiados com isoflurano (2-3% a 100% de oxigênio) e foi realizada a perfusão transcardíaca com 0,1 M de PBS, seguido de paraformaldeído (PFA) a 4% em 0,1M PBS. Foram retiradas amostras do nervo isquiático no local da lesão, de camundongos BALB/cJ selvagens (WT) e IL-4^{-/-}. Também foram utilizados camundongos Swiss, eutanasiados pelo mesmo procedimento descrito anteriormente, dos quais realizou-se a coleta da porção lombar da medula espinal (L3-L6) e do tronco encefálico.

4.8.1 Imunofluorescência de macrófagos no nervo isquiático

Para a imunomarcção de macrófagos dos subtipos M1 e M2_{a/c} as amostras do nervo isquiático de camundongos BALB/cJ WT e IL-4^{-/-} dos grupos: WT Sham (n=5), WT Sedentário (n=5), WT Exercitado (n=5), IL-4^{-/-} Sedentário (n=6) e IL-4^{-/-} Exercitado (n=6) foram pós-fixadas em 4% de PFA *overnight* (4°C) e, no dia seguinte, a solução foi alterada para 30% de sacarose em PBS (4°C) por 24 horas para a desidratação. Por fim, as amostras foram incluídas em solução de congelamento (*Optimal Cutting Temperature compound*, OCT) e mantidas a -80°C até a realização dos cortes. As amostras foram cortadas com o uso do criostato em 10-12 µm e montados em lâminas de vidro. Cortes de todos os animais foram processados e imunomarcados simultaneamente.

Após as lavagens com PBS, as amostras foram bloqueadas com *Fc Receptor Block* seguido por 10% de *Normal Goat Serum* (NGS). Para a imunomarcção de macrófagos, as lâminas foram incubadas *overnight* (4°C) com os seguintes anticorpos primários: hamster anti-CD11c (Abdserotec, 1:100; para a marcação de macrófagos M1) ou Biotin rat anti-αCD206 (Abdserotec, 1:200; para marcação de macrófagos M2_{a/c}). No segundo dia todas as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS durante 5 minutos cada e seguiram pela incubação por 30 minutos com o fragmento não conjugado Goat anti-rat Fab fragment (JIR) (1:100), após, foram fixados por 10 minutos com 1% PFA em PBS e incubados por 3 horas com o anticorpo primário Rat anti-F4/80 (Abdserotec, 1:250). As lâminas previamente imunomarcadas para macrófagos M1 foram também incubadas com o anticorpo secundário Goat anti-hamster IgG-Rhod-Red-X (1:500, Jackson Immuno Research),

seguido pela incubação com os anticorpos secundários Fab fragment Goat anti-rat Dylight 488 (1:500, Jackson Immuno Research) + Goat anti-hamster IgG-Rhod-Red-X (1:100, Jackson Immuno Research) + 4% de soro de camundongo, por 1 hora. As lâminas previamente marcadas para macrófagos M2_{a/c} foram também incubadas com Streptavidin-568 por 3 horas (Vector Labs, 1:5000), seguido pela incubação com os anticorpos secundários Fab Fragment Goat-anti rat Dylight-488 (1:500, Jackson Immuno Research) + Streptavidin-568 (Invitrogen 1:500) + 4% de soro de camundongo, durante 1 hora. Todos os anticorpos foram diluídos igualmente (100% de anticorpo + 1% NGS + 0,1% Triton X-100 + 1:100 Azida de sódio). Por fim, as lâminas foram cobertas com lamínulas com auxílio de *Vectashield* (Vector Labs, CA, EUA).

4.8.2 Imunofluorescência dos SERT nos núcleos caudais da rafe bulbar

Para a imunomarcagem dos SERT, as amostras do tronco encefálico de camundongos Swiss dos grupos: Sham (n=4), Sedentário (n=5) e Exercitado (n=5) foram pós-fixados em 4% de PFA *overnight* (4°C) e, no dia seguinte, a solução foi alterada para 30% de sacarose em PBS (4°C) por 24 horas para a desidratação. Por fim, as amostras foram incluídas em OCT e mantidas a -80°C até a realização dos cortes. Foram realizados cortes seriados de 20 µm dos núcleos caudais da rafe bulbar com o uso do criostato e montados em lâminas de vidro. Cortes de todos os animais foram processados e imunomarcados simultaneamente.

As lâminas foram lavadas com PBS e bloqueadas com 10% de NGS seguido pelo bloqueio com Avidina/Biotina. Depois de lavadas com PBS, as amostras foram incubadas *overnight* (4°C) com o anticorpo primário Rabbit anti-5-HT transporter (ImmunoStar, 1:500). No segundo dia todos os cortes foram lavados duas vezes em PBS durante 5 minutos cada, seguidos pela incubação por 1 hora com o anticorpo secundário Biotinylated Goat anti-Rabbit IgG (Invitrogen, 1:1000) e então, seguido pela incubação com streptavidina conjugada ao Alexa Fluor[®] 568 (Life Technologies, 1:500, por 1 hora). Todos os anticorpos foram diluídos igualmente (100% de anticorpo + 1% NGS + 0,1% Triton X-100 + 1:100 Azida de sódio). Por fim, as lâminas foram cobertas com lamínulas com auxílio de *Vectashield* (Vector Labs).

4.8.3 Imunofluorescência de astrócitos e microglia na medula espinal

Para a imunomarcção de células gliais no corno dorsal da medula espinal lombar (L3-L6) de camundongos Swiss, foram utilizados os seguintes grupos: Sham (n=4), Sedentário (n=4) e Exercitado (n=6). As amostras foram pós-fixados em 4% de PFA *overnight* (4°C) e, no dia seguinte, a solução foi alterada para 30% de sacarose em PBS (4°C) por 24 horas para a desidratação. Por fim, as amostras foram incluídas em OCT e mantidas a -80°C até a realização dos cortes. Foram realizados cortes seriados de 20 µm com o uso do criostato e montados em lâminas de vidro. Cortes de todos os animais foram processados e imunomarcados simultaneamente.

As lâminas foram lavadas com PBS e bloqueadas com 3% de NGS seguido pelo bloqueio com Avidina/Biotina. Depois de lavadas com PBS, as amostras foram incubadas *overnight* (4°C) com o anticorpo primário monoclonal Mouse anti-GFAP (Millipore, 1:1000) para a imunomarcção de astrócitos ou anticorpo policlonal Rabbit anti-Iba1 (Wako, 1:250) para imunomarcção da microglia. No segundo dia, todos os cortes foram lavados duas vezes em PBS durante 5 minutos cada, seguidos pela incubação por 1 hora com o anticorpo secundário Biotinylated Goat anti-Mouse ou Goat anti-Rabbit IgG (Invitrogen, 1:1000, 1 hora) de acordo com a espécie hospedeira do anticorpo primário, e então, seguido pela incubação por 1 hora com streptavidina conjugada ao Alexa Fluor® 568 (Life Technologies, 1:1000). Todos os anticorpos foram diluídos igualmente (100% de anticorpo + 1% NGS + 0,1% Triton X-100 + 1:100 Azida de sódio). Por fim, as lâminas foram cobertas com lamínulas com auxílio de *Vectashield* (Vector Labs).

4.8.4 Microscopia confocal, captura e análise das imagens

Para capturar as imagens, foi utilizado o microscópio confocal BioRad Laser Sharp 2000 (BioRad, Hercules, CA, EUA) da *University of Iowa* (EUA), de acordo com os procedimentos exigidos pela instituição. Foi escolhido o local a ser capturado visualmente, utilizando uma câmera objetiva de 20X. O filtro de epifluorescência utilizado foi o FITC/Cy3/F4, ajustando o nível dos parâmetros (*Iris*, *gain* e *offset*) em cada canal para otimização da imagem. Usando o *focus motor*, foram retiradas pelo menos três fotografias em cada imagem de captura (camadas), num total de 5 capturas por animal. Para a análise das

imagens e quantificações das células imunomarcadas foi utilizado o programa “Image J” (NIH).

Para a quantificação de macrófagos foram utilizadas três secções por lâmina, fotografadas um total de doze imagens por lâmina e uma lâmina por animal para cada imunomarcção (F4/80 + CD11c ou F4/80 + α CD206). Cada imagem foi avaliada individualmente para a contagem da quantidade de macrófagos totais, onde a morfologia e a cor (F4/80 - em verde) indicassem isso. Além disso, foram colocalizados os macrófagos verdes (F4/80) com os macrófagos vermelhos (CD11c ou α CD206), o que gerou uma terceira imagem, com a cor amarela onde ocorria essa colocalização, confirmando como sendo um macrófago M1 ou M2_{a/c}, respectivamente, e contabilizado como diferencial de macrófagos (quantidade ou montante de M1 ou M2_{a/c}, demonstrado no gráfico em porcentagem).

Para a quantificação dos SERT foi utilizado uma imagem por lâmina (três lâminas por animal) de cada um dos seguintes núcleos: núcleo pálido da rafe (RPa), RMg e núcleo obscuro da rafe (ROb). Em cada imagem, cada núcleo avaliado foi delineado e o número de pixels ocupados pelas células imunorreativas foi mensurado. Especificamente, cada imagem foi primeiramente convertida para *eight-bit gray scale*, e então, calibrada independentemente usando a função *uncalibrated OD*, os valores de densidade óptica representaram a quantidade de pixels por área e foram expressos em unidades arbitrárias.

Para a quantificação da reatividade das células gliais foram utilizadas quatro imagens por secção, do lado direito ou esquerdo do corno dorsal da medula espinal, foram fotografados um total de três secções por lâmina e uma lâmina por animal de cada imunomarcção (GFAP e Iba-1). Além disso, as lâminas superficiais (I-II) e as intermediárias e profundas (III-VI) foram delineadas e o número de pixels ocupados pelas células imunorreativas foi mensurado. Primeiramente, cada imagem foi convertida para *eight-bit gray scale*, e então, calibrada independentemente, usando a função *uncalibrated OD*. Os valores de densidade óptica representaram a quantidade de pixels por área e foram expressos em unidades arbitrárias.

4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

No 15º dia após a lesão do nervo, 24 horas após a última sessão de exercício físico, os animais foram anestesiados com isoflurano (2-3% a 100% de oxigênio) e foi realizada a perfusão transcardíaca com 0,1 M

de PBS, seguido de uma solução fixadora contendo glutaraldeído 3% e paraformaldeído (PFA) 1,5% em 0,1M PBS pH 7,4. Foram retiradas amostras do nervo isquiático no local da lesão, de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado (n=3/grupo).

4.9.1 Microscopia eletrônica

Para a análise histológica do tecido neural, as amostras coletadas foram colocadas na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão, durante 24 horas. Após a fixação, as amostras foram preparadas para inclusão em resina de acordo com os seguintes passos: i) três lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (30 minutos cada); ii) pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% tamponado (durante 1 hora); iii) três lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (15 minutos cada). A desidratação iniciou com: i) acetona 30% (2 × de 30 minutos cada); ii) acetona 50% (2 × de 15 minutos cada); iii) acetona 70% (2 × de 15 minutos cada); iv) acetona 100% (2 × de 30 minutos cada). A pré-embebição dos materiais foi feita em uma mistura de resina Spurr com acetona pura nas seguintes proporções: i) 25% de resina + 75% de acetona (2 horas); ii) 50% de resina + 50% de acetona (2 horas); iii) 75% de resina + 25% de acetona (2 horas); iv) 100% de resina (3 horas). As amostras foram incluídos em resina Spurr pura e colocados em uma estufa a 60° C durante 24 horas para a polimerização (RAIMONDO et al. 2009).

Após a inclusão foram realizados primeiramente os cortes semifinos, com navalha de vidro no ultramicrotomo RMC, com espessura de 0,5 µm. Posteriormente, após a escolha da área de interesse, foram realizados os cortes ultrafinos com navalha de diamante na espessura de 70 nm. Estes cortes foram montados em grades de cobre e contrastados com solução aquosa de acetato de uranila (2%) e citrato de chumbo (1%). A observação dos cortes ultrafinos foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1011, JEOL, Tokyo, Japan), equipado com um sistema de aquisição de imagem (MegaView II, Analysis- Imaging System), do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME, UFSC). Foram capturadas imagens nos aumentos entre 5000 e 150000×.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no software Graph Pad Prism for Windows versão 5.01 (2007) (Graph Pad Software, La Jolla, CA, EUA). Os dados apresentados possuem uma distribuição normal, de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Desta forma, os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). Para a análise dos dados comportamentais, foi empregado a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni para múltiplas comparações. As análises estatísticas entre os grupos experimentais dos parâmetros bioquímicos, imunológicos, moleculares e imunoistológicos e no teste do campo aberto, foram realizadas por meio da ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. Em todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 PARTE I - PAPEL DAS INTERAÇÕES NEUROIMUNES NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO E NEUROREGENERATIVO DO EXERCÍCIO FÍSICO APÓS A LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO

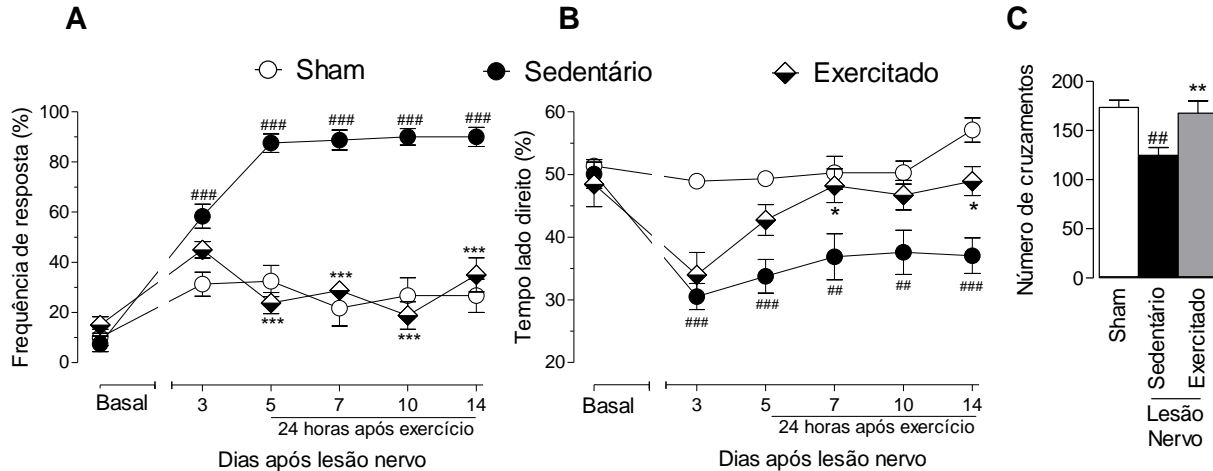
5.1.1 Efeito do exercício físico na hiperalgesia mecânica, no processamento cortical da nocicepção e na locomoção espontânea

O procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático produziu uma intensa e prolongada hiperalgesia mecânica nos animais do grupo Sedentário, mostrada através dos testes de von Frey e do paradigma fuga/esquiva (Figura 11A e B, respectivamente), com alterações comportamentais evidentes do 3º ao 14º dia após a lesão, quando comparados ao grupo falso operado (Sham) ($P < 0,01$ e $< 0,001$). Estes resultados indicam alteração da função sensorial da pata traseira direita, bem como, no processamento da nocicepção em nível cortical, no grupo que teve o nervo isquiático lesionado e não foi submetido ao exercício físico (Sedentário). Estes dados confirmam os nossos dados anteriores e a indução das alterações comportamentais relacionadas ao modelo adotado (BOBINSKI et al., 2011b).

No 15º dia após a lesão no nervo, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (Figura 11C), onde foi observada a locomoção espontânea dos animais a fim de relacionar este comportamento ao de dor espontânea, característico da dor neuropática. O teste mostrou que o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático no grupo Sedentário reduziu a locomoção dos animais ($P < 0,01$), quando comparado aos animais do grupo Sham. No entanto, o exercício físico foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica (Figura 11A) do 5º ao 14º dia após a lesão no nervo, quando comparados os animais do grupo Exercitado vs. Sedentário ($P < 0,001$). Além disso, o exercício físico foi capaz de permitir aos animais permanecerem mais tempo do lado direito na caixa de avaliação no paradigma fuga/esquiva (Figura 11B). Este efeito foi evidenciado nos dias 7 e 10 após a lesão do nervo, no grupo Exercitado, quando comparados ao grupo Sedentário ($P < 0,5$). O teste demonstrou que os animais Exercitados reduziram o comportamento de fuga/esquiva, indicando uma melhora na função sensorial a nível supraespinhal, após a lesão traumática do nervo isquiático. Do mesmo

modo, o exercício físico foi capaz de aumentar a atividade locomotora espontânea dos animais do grupo Exercitado no teste do campo aberto (Figura 11C), quando comparados aos animais do grupo Sedentário ($P < 0,01$).

Figura 11 - Efeito do exercício físico na hiperalgesia mecânica, no processamento cortical da nociceção e na locomoção espontânea



Legenda: Avaliação da hiperalgesia mecânica realizada pelo teste de von Frey (painel A), do processamento cortical da nociceção na avaliação pelo paradigma fuga/esquiva (painel B) e da atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto (painel C), em camundongos Swiss. Os painéis A e B representam as avaliações basais (antes de qualquer procedimento); no terceiro dia após a lesão no nervo (dia 3), antes do tratamento com o exercício físico e nos dias 5, 7, 10 e 14 após a lesão do nervo, 24 h após o tratamento com exercício físico. O painel C representa a avaliação da atividade locomotora espontânea realizada no 15º dia após a lesão do nervo isquiático.

Continuação da legenda da Figura 11.

Os valores representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo comparados estatisticamente através de ANOVA de duas vias com medidas repetidas (A e B), seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ou ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls (C). ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$, quando comparado ao grupo Sham; * $P < 0,05$, * $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, quando comparado ao grupo Sedentário.

Fonte: A autora (2015).

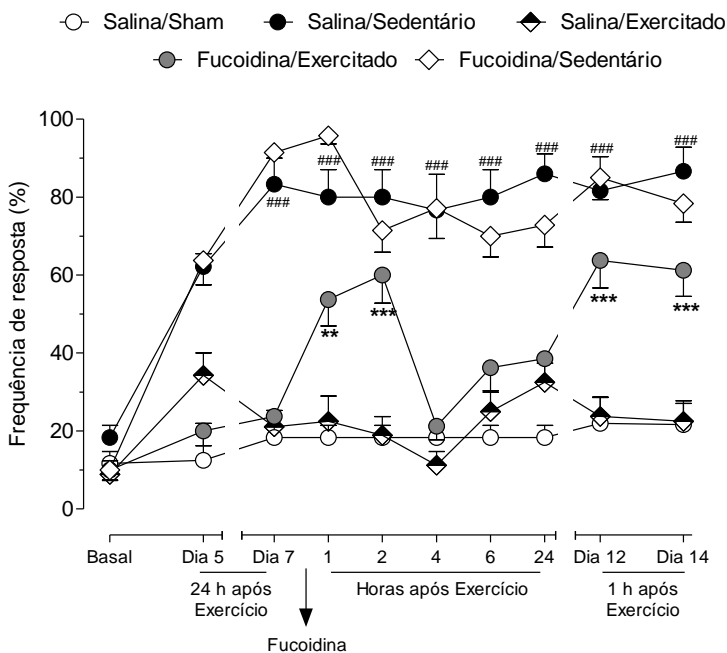
5.1.2 Papel da migração dos leucócitos para o local da lesão no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram, mais uma vez, a indução da hiperalgesia mecânica nos animais que foram submetidos à lesão do nervo isquiático. Quando comparados os animais do grupo Salina/Sedentário aos animais do grupo Salina/Sham, observou-se um aumento da frequência de retirada da pata no teste de von Frey, do 5º ao 14º dia após a lesão ($P < 0,001$). Do mesmo modo, os resultados demonstram o consistente efeito anti-hiperalgésico no grupo Salina/Exercitado, nas duas semanas de avaliação, quando comparado ao grupo Salina/Sedentário ($P < 0,001$).

A fim de avaliar se o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico dependia da migração leucocitária, foi realizado o pré-tratamento dos animais com fucoidina (10 mg/kg, i.p.), 20 minutos antes do tratamento com o exercício físico, diariamente. No 7º dia após a lesão do nervo isquiático, os animais foram avaliados antes da administração de fucoidina ou veículo e 1, 2, 4, 6 e 24 horas após o tratamento com exercício físico. Nota-se a redução do efeito anti-hiperalgésico dos animais tratados com exercício físico até 2 horas após a sessão de exercício, quando comparados os grupos: Salina/Exercitado vs. Fucoidina/Exercitado ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, na 1º e 2º hora, respectivamente). As demais avaliações foram realizadas no 12º e 14º dia após a lesão no nervo, 1 hora após o exercício físico, demonstrando novamente a redução do efeito anti-hiperalgésico do exercício, quando comparados os grupos: Salina/Exercitado vs. Fucoidina/Exercitado ($P < 0,001$). Um grupo de animais que não foi submetido ao exercício físico, pré-tratado com fucoidina (Fucoidina/Sedentário) foi utilizado como controle para verificar o possível efeito per se da fucoidina após a lesão

do nervo; não houve diferença estatística significativa neste grupo quando comparado ao grupo Salina/Sedentário ($P > 0,05$).

Figura 12 - Papel da migração de leucócitos para o local da lesão no efeito do exercício físico



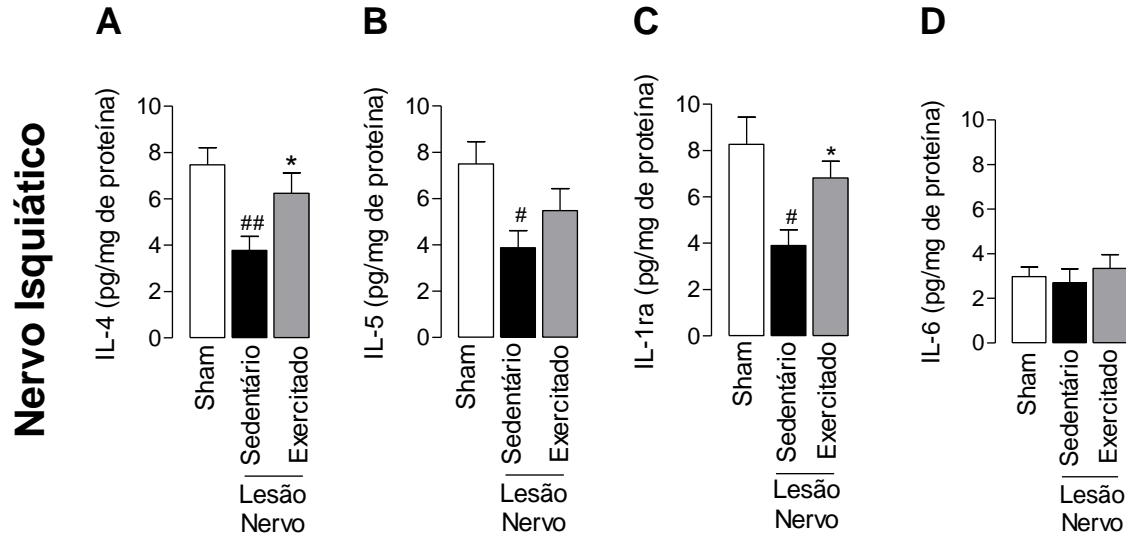
Legenda: Avaliação da hiperalgesia mecânica realizada pelo teste de von Frey nos animais pré-tratados com Fucoidina (10 mg/kg, i.p.) e/ou Salina (10 ml/kg, i.p.), e posteriormente submetidos ou não ao exercício físico. As avaliações foram realizadas antes de qualquer procedimento (Basal) e nos dias 5 e 7 após a lesão no nervo, 24 horas após a última sessão de exercício físico; no dia 7, as avaliações foram realizadas na 1^o, 2^o, 4^o, 6^o e 24^o hora após o exercício físico; nos dias 12 e 14, as avaliações foram realizadas 1 hora após a realização do exercício físico. Os dados são expressos como média \pm EPM de 6-8 animais por grupo comparados estatisticamente através de ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. ### $P < 0,001$, quando comparado ao grupo Salina/Sham; ¹ $P < 0,001$, quando comparado ao grupo Salina/Sedentário; * $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, quando comparado ao grupo Salina/Exercitado.

Fonte: A autora (2015).

5.1.3 Efeito do exercício físico nas concentrações das interleucinas IL-4, IL-5, IL-1ra e IL-6 no nervo isquiático

A Figura 13 demonstra que o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático reduziu as concentrações das interleucinas anti-inflamatórias IL-4 ($P < 0,01$; Figura 13A), IL-5 ($P < 0,05$; Figura 13B) e IL-1ra ($P < 0,05$; 13C) no nervo isquiático do grupo Sedentário, quando comparado ao grupo Sham, no 15º dia após a lesão. Ao contrário, duas semanas de tratamento com exercício físico foram capazes de aumentar as concentrações da IL-4 ($P < 0,05$) e da IL-1ra ($P < 0,05$), quando comparados os grupos de animais lesionados: Exercitado vs. Sedentário. Os animais do grupo Exercitado apresentaram um aumento parcial, porém não significativo ($P = 0,054$) da concentração da IL-5 no nervo isquiático quando comparados aos animais do grupo Sedentário. Além disso, não foram observadas alterações nas concentrações teciduais de IL-6 entre os animais do grupo Sham, Sedentário ou Exercitado ($P = 0,74$; Figura 13D).

Figura 13 - Efeito do exercício físico nas concentrações das interleucinas IL-4, IL-5, IL-1ra e IL-6 no nervo isquiático



Legenda: Efeito do exercício físico sobre as concentrações das interleucinas IL-4 (painel A), IL-5 (painel B), IL-1ra (painel C) e IL-6 (painel D) no nervo isquiático de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão no nervo. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5-8 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. ^{##} $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sham; ^{*} $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Sedentário.

Fonte: A autora (2015).

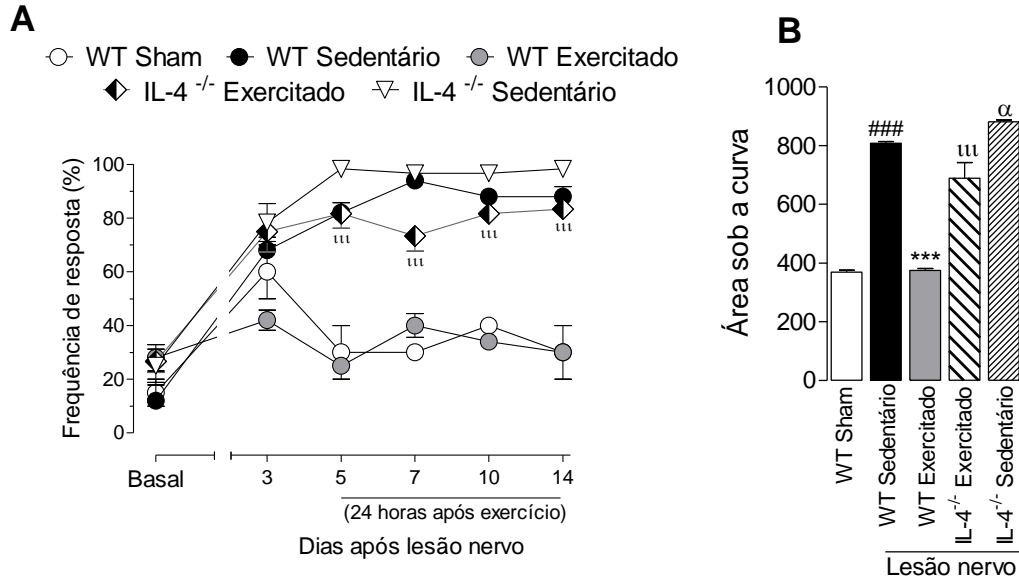
5.1.4 Efeito do exercício físico na hiperalgesia mecânica em animais BALB/cJ WT e IL-4^{-/-}

Sabe-se da importância da IL-4 como uma citocina que participa da alteração fenotípica de macrófagos para o subtipo M2 e que induz uma resposta imune Th2 para o remodelamento da lesão tecidual (MOKARRAM et al., 2012), além de que, sua deficiência está associada à hiperalgesia mecânica em camundongos (ÜÇEYLER et al., 2011). Observando os nossos dados que demonstraram o aumento das concentrações de IL-4 no nervo isquiático após duas semanas de tratamento com exercício físico nos animais submetidos a lesão do nervo isquiático, avaliamos o efeito do exercício sobre a hiperalgesia mecânica em animais BALB/cJ WT e seus congênicos IL-4^{-/-}.

A Figura 14 (A e B) demonstra a evidente hiperalgesia mecânica após a lesão traumática do nervo isquiático, nos animais BALB/cJ selvagens (WT Sedentário) e *knockouts* para IL-4 (IL-4^{-/-} Sedentário e IL-4^{-/-} Exercitado) do 5º ao 14º dia, em comparação aos animais falso-operados (WT Sham), confirmando as mesmas alterações comportamentais relacionadas ao modelo previamente realizado em camundongos Swiss. A análise estatística da área sob a curva demonstra o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica nos animais do grupo WT Sedentário, em comparação aos animais do grupo WT Sham ($P < 0,001$, Figura 14B). Por outro lado, quando os animais foram exercitados após a lesão, no grupo WT Exercitado, apresentaram redução significativa da hiperalgesia mecânica quando comparados aos animais do grupo WT Sedentário ($P < 0,001$, Figura B), além de não demonstrarem alterações na frequência de retirada da pata em relação aos animais do grupo WT Sham ($P > 0,05$, Figura B).

O papel da IL-4 no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico foi demonstrado quando comparados os grupos de animais WT Exercitado vs. IL-4^{-/-} Exercitado. A análise estatística denotou uma redução significativa do efeito anti-hiperalgésico do exercício físico no grupo IL-4^{-/-} Exercitado do 5º ao 14º dia após a lesão no nervo ($P < 0,01$; Figura A), o mesmo foi observado na análise estatística da área sob a curva quando comparados os grupos WT Exercitado vs. IL-4^{-/-} Exercitado ($P < 0,01$; Figura B). No entanto, quando comparados os grupos de animais IL-4^{-/-} Sedentário vs. IL-4^{-/-} Exercitado, observamos que mesmo nos animais *knockouts* para a IL-4 o exercício físico é capaz de promover uma redução da hiperalgesia mecânica após a lesão do nervo ($P < 0,05$; Figura B).

Figura 14 - Efeito do exercício físico na hiperalgesia mecânica em animais BALB/cJ WT e IL-4^{-/-}



Legenda: Efeito do exercício físico sobre a hiperalgesia mecânica avaliada pelo teste de von Frey em animais BALB/cJ e IL-4^{-/-} submetidos à lesão traumática do nervo isquiático. Foram realizadas as avaliações basais (antes de qualquer procedimento); no terceiro dia após a lesão no nervo (dia 3), antes do tratamento com o exercício físico e nos dias 5, 7, 10 e 14 após a lesão no nervo, 24 h após o tratamento com exercício físico.

Continuação da legenda da Figura 14

O painel A demonstra as avaliações nos grupos WT Sham, WT Sedentário e WT Exercitado, IL-4^{-/-} Exercitado e IL-4^{-/-} Sedentário, comparados estatisticamente através de ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. O painel B demonstra a área sob a curva referente ao gráfico A, avaliada através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. Os valores representam a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. ^{####} $P < 0,001$, quando comparado ao grupo WT Sham; ^{***} $P < 0,001$, quando comparado ao grupo WT Sedentário. ⁱⁱⁱ $P < 0,001$, quando comparado ao grupo WT Exercitado; ^a $P < 0,05$, quando comparado ao grupo IL-4^{-/-} Exercitado.

Fonte: A autora (2015).

5.1.5 Efeito do exercício físico e papel da IL-4 na migração e no fenótipo de macrófagos presentes no nervo isquiático após a lesão

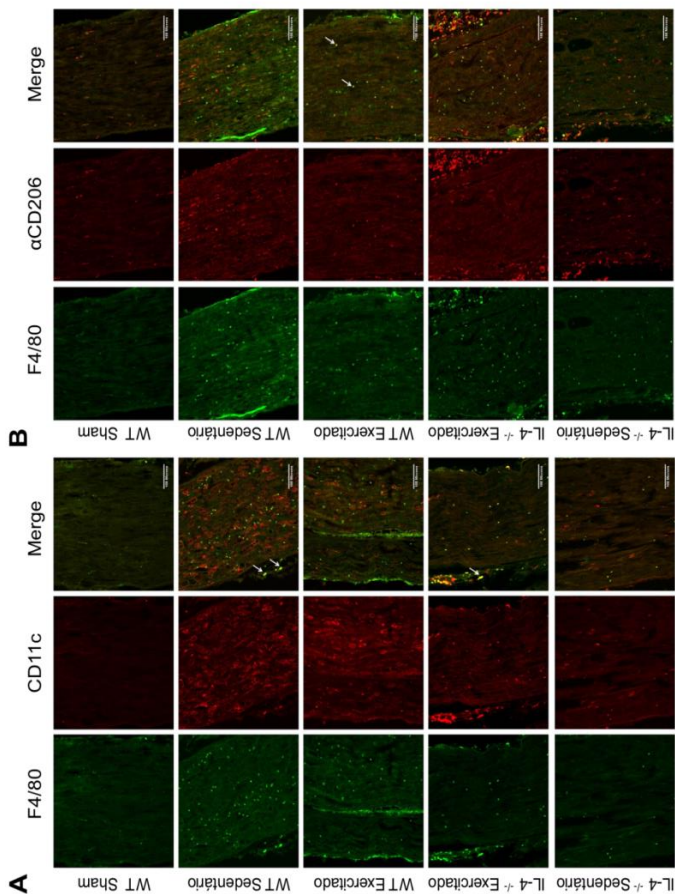
A fim de avaliar a possível contribuição do exercício físico por um mecanismo dependente de IL-4 sobre a migração e a diferenciação de macrófagos no local da lesão, foi realizada a imunomarcagem para os subtipos específicos de macrófagos M1 (CD11c) e M2_{a/c} (α CD206), representados através das fotomicrografias confocais da imunofluorescência no nervo isquiático na Figura , A e B, respectivamente.

A Figura C demonstra que após a lesão houve um aumento significativo no número de macrófagos totais presentes no nervo isquiático, quando comparados os grupos WT Sedentário vs. WT Sham ($P < 0,001$). Além disso, observou-se que, proporcionalmente, houve um incremento do número de macrófagos do tipo M1 ($P < 0,001$) e uma redução de macrófagos M2_{a/c} ($P < 0,01$) no grupo WT Sedentário, quando comparado ao grupo WT Sham (Figura D). Além disso, verificou-se que no grupo WT Exercitado não ocorre modificação no número de macrófagos totais que migram para o local da lesão no nervo isquiático, quando comparado ao grupo WT Sedentário ($P > 0,05$; Figura C). No entanto, a contagem diferencial de macrófagos demonstra que o grupo de animais WT Exercitado apresenta uma porcentagem maior de macrófagos M2_{a/c} ($P < 0,001$) e menor de macrófagos M1 ($P < 0,001$) em relação ao grupo WT Sedentário (Figura D), caracterizando

uma inversão fenotípica dos macrófagos no local da lesão após o tratamento com o exercício físico.

Quando avaliamos o número total de macrófagos no nervo após a lesão entre os grupos WT Sedentário e IL-4^{-/-} Sedentário, não houve diferença estatística ($P > 0,05$; Figura C), demonstrando que a migração de macrófagos é dependente da lesão, e não da característica genética dos animais. Ainda assim, quando observamos o diferencial fenotípico dos macrófagos, notamos que em comparação ao grupo WT Exercitado, os animais do grupo IL-4^{-/-} Exercitado demonstraram um incremento de macrófagos do subtipo M1 ($P < 0,001$) e uma redução de macrófagos do subtipo M2_{a/c} ($P < 0,001$) (Figura D). Observou-se também, que entre os animais IL-4^{-/-} havia uma diferença estatisticamente significativa no número total, bem como no fenótipo de macrófagos, quando os animais foram submetidos ao exercício físico, após a lesão no nervo. O grupo de animais IL-4^{-/-} Sedentário apresentou um número menor de macrófagos totais ($P < 0,05$; Figura C), com uma proporção maior de células do subtipo M1 ($P < 0,01$), sem alterações dentre as células do fenótipo M2_{a/c}, quando comparados aos animais do grupo IL-4^{-/-} Exercitados (Figura D).

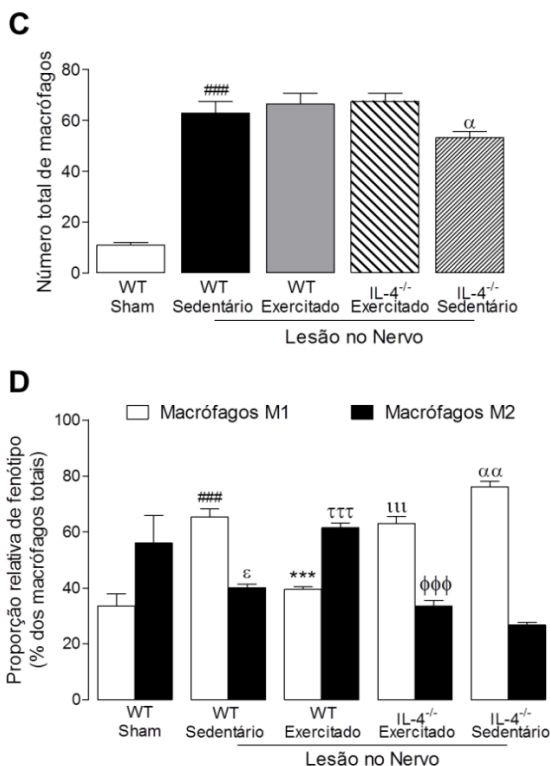
Figura 15 A e B - Efeito do exercício físico e papel da IL-4 na migração e fenótipo de macrófagos presentes no nervo isquiático após a lesão



Legenda: Imunofluorescência do nervo isquiático de camundongos BALB/cJ selvagens (grupos: WT Sham, WT Sedentário e WT Exercitado); e *knockout* para IL-4 (grupos: IL-4^{-/-} Exercitado e IL-4^{-/-} Sedentário), no 15^o após a lesão do nervo e tratamento com exercício físico. Fotomicrografias confocais das imunomarcações para macrófagos (F4/80) em verde e macrófagos M1 (CD11c) em vermelho, a terceira coluna demonstra a colocalização destas proteínas, evidenciando a marcação de macrófagos M1 em amarelo (painel A). Fotomicrografias confocais das imunomarcações para macrófagos (F4/80) em verde e macrófagos M2_{a/c} (αCD206) em vermelho, destacando na terceira coluna a colocalização para macrófagos M2_{a/c} em amarelo (painel B). Escala: 100 μm. Aumento 20x.

Fonte: A autora (2015).

Continuação da Figura 15 C e D - Efeito do exercício físico e papel da IL-4 na migração e fenótipo de macrófagos presentes no nervo isquiático após a lesão



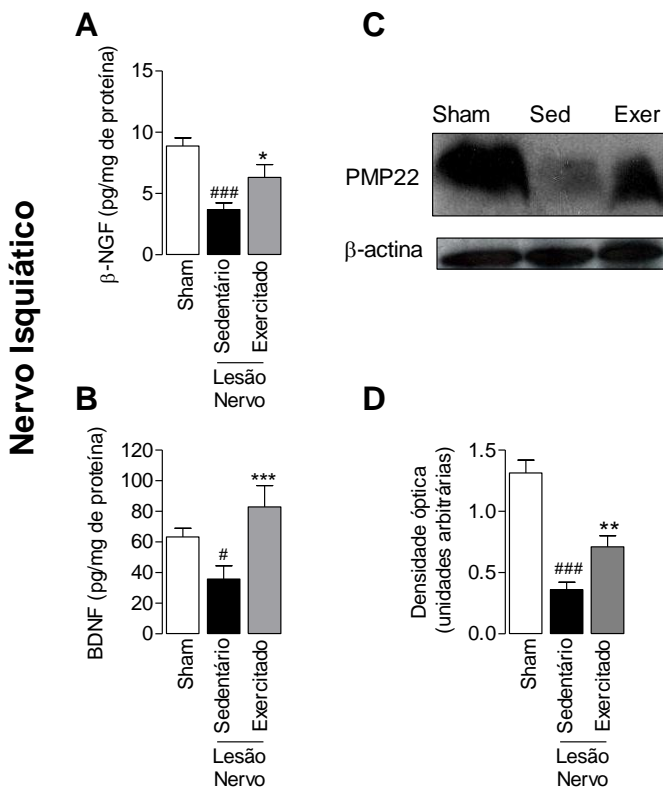
Continuação da legenda da Figura 15.

Os painéis C e D indicam a quantificação do número total de macrófagos e o diferencial de macrófagos M1 e M2_{a/c}, respectivamente. Os dados são expressos como média ± EPM de 4-6 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. ###P<0,001 em relação ao grupo WT Sham (C) e M1 WT Sham (D); ε P<0,05 em relação ao grupo M2 WT Sham (D); ***P<0,001 em relação ao grupo M1 WT Sedentário (D); ttt P<0,001 em relação ao grupo M2 a/c WT Sedentário (D); lll P<0,001 em relação ao grupo M1 WT Exercitado (D); φφφ P<0,001 em relação ao grupo M2 a/c WT Exercitado (D); α P<0,05 e αα P<0,01 em relação ao grupo IL-4^{-/-} Exercitado (C) e M1 IL-4^{-/-} Exercitado (D).
 Fonte: A autora (2015).

5.1.6 Efeito do exercício físico nas concentrações das neurotrofinas BDNF e β -NGF e da proteína da mielina PMP22 no nervo isquiático

Os resultados deste experimento indicaram que o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático reduziu as concentrações das neurotrofinas β -NGF ($P < 0,001$; Figura A) e BDNF ($P < 0,05$; Figura B) no local da lesão no grupo de animais Sedentário, quando comparado ao grupo de animais Sham, no 15º dia após o esmagamento. Ao contrário, o tratamento com exercício físico foi capaz de aumentar as concentrações de β -NGF ($P < 0,05$) e BDNF ($P < 0,001$), quando comparados os grupos de animais lesionados: Exercitado vs. Sedentário (Figura A e B). Quando avaliada a proteína da mielina PMP22 no nervo isquiático, observou-se que após a lesão nos animais do grupo Sedentário, houve redução significativa da densidade de imunomarcção desta proteína em comparação aos animais do grupo Sham ($P < 0,001$; Figura D). Neste caso, o tratamento com exercício físico após a lesão foi capaz de aumentar significativamente a densidade de imunomarcção da PMP22, no grupo Exercitado, quando comparado aos animais lesionados do grupo Sedentário ($P < 0,01$; Figura D). A densidade de imunomarcção para esta proteína está destacada na figura do filme de revelação do Western Blotting (Figura C).

Figura 16 - Efeito do exercício físico nas concentrações das neurotrofinas BDNF e β -NGF e da proteína da mielina PMP22 no nervo isquiático



Legenda: Os painéis A e B demonstram as concentrações das neurotrofinas β -NGF e BDNF, respectivamente, no nervo isquiático de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão. O painel C demonstra a figura do filme de revelação do Western Blotting da proteína da mielina PMP22 nos grupos Sham (Sham), Sedentário (Sed) e Exercitado (Exer). O painel D mostra a quantificação da densidade óptica das bandas de imunomarcacão para a proteína PMP22 no nervo isquiático de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão no nervo. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5-8 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Student-Newman-Keuls. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sham; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo Sedentário.

Fonte: A autora (2015).

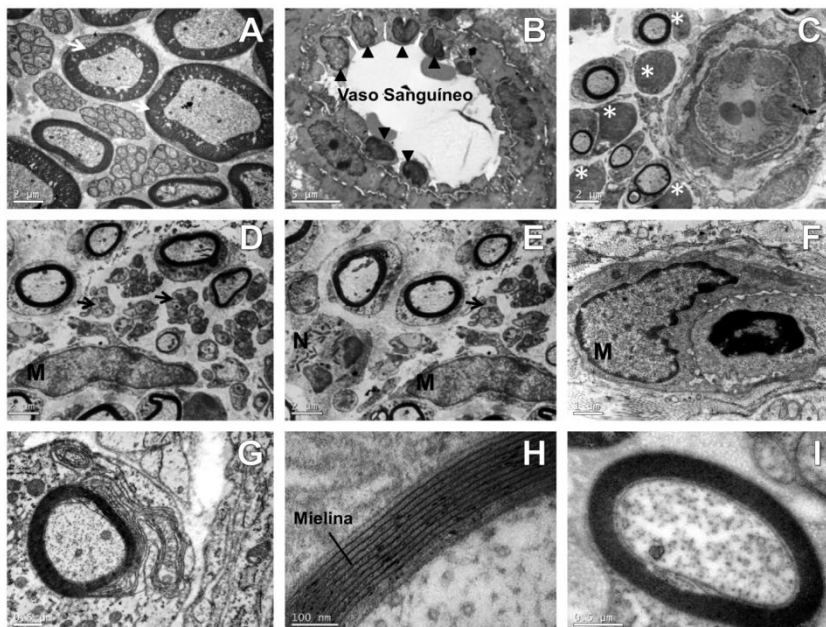
5.1.7 Degeneração Walleriana distal após a lesão por esmagamento do nervo isquiático de camundongos

A análise histológica do nervo isquiático através de microscopia eletrônica (Figura 17) nos animais dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, mostrou os eventos do processo de degeneração Walleriana distal que ocorrem após a lesão. Na Figura 17A, a eletromicrografias de um animal do grupo Sham demonstrou um padrão normal de morfologia e distribuição de fibras nervosas. Nestes animais, observaram-se as fibras nervosas de grande e intermediário diâmetro (fibras A β e A δ) com uma densa camada de mielina, e também, fibras não mielinizadas de pequeno diâmetro (fibras C) em *clusters* bem organizados e espaço endoneural compacto.

A Figura 17 (B, C, D e E), destaca as eletromicrografias do nervo isquiático de animais do grupo Sedentário. No geral, nestes animais, foi observada a predominância de fibras nervosas mielinizadas de pequeno diâmetro, um aumento do tecido conectivo endoneural entre as fibras. A Figura 17B mostra um vaso sanguíneo com vários leucócitos muito próximos da parede do vaso, estas células provavelmente migraram para o tecido neural lesionado. Além disso, destaca-se o fato de que estes leucócitos são em sua maioria mononucleares. A Figura 17C mostra a proliferação, diferenciação e ativação de células de Schwann, que se apresentaram com um núcleo mais proeminente. Também, observou-se a presença de *debris* de degeneração celular. A Figura 17 (D e E) destaca principalmente a diminuição do diâmetro das fibras mielinizadas e a diminuição da bainha de mielina comparada com o animal do grupo Sham, o brotamento de fibras não mielinizadas, um amplo espaço endoneural e a presença de células como macrófagos e neutrófilos.

A Figura 17 (F, G, H e I), mostra as eletromicrografias do nervo isquiático de animais do grupo Exercitado. Na Figura 17F, observou-se um macrófago promovendo a fagocitose dos *debris* celulares. Além disso, como uma demonstração da aceleração do processo de regeneração promovido pelo exercício físico, observou-se a presença de várias células em processo de remielinização, como exemplificado na Figura 17G, em que a membrana da célula de Schwann mielinizada envolve o axônio. Observaram-se também, na Figura 17 (H e I), axônios mielinizados regenerados após a lesão, com uma densa camada de mielina.

Figura 17 - Degeneração Walleriana distal após a lesão por esmagamento do nervo isquiático de camundongos



Legenda: Eletromicrografias das secções transversas ultrafinas do nervo isquiático de camundongos dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão traumática do nervo isquiático. (A) Eletromicrografia do nervo isquiático de um animal do grupo Sham demonstrando fibras nervosas de grande diâmetro com uma densa camada de mielina (seta branca), fibras não mielinizadas em *clusters* bem organizados e espaço endoneurial compacto. (B, C, D e E) Eletromicrografias do nervo isquiático de animais do grupo Sedentário. O painel B demonstra os leucócitos num vaso sanguíneo (triângulo preto), que provavelmente migrarão para o tecido neural lesionado. O painel C demonstra a proliferação e diferenciação de células de Schwann (*) que se apresentam com o núcleo aumentado. Os painéis D e E demonstram principalmente a diminuição do diâmetro das fibras mielinizadas e a diminuição da bainha de mielina comparada com o animal do grupo Sham, o brotamento de fibras não mielinizadas (seta preta), um amplo espaço endoneurial e a presença de células como macrófago (M) e neutrófilo (N). (F, G, H e I) Eletromicrografias do nervo isquiático de animais do grupo Exercitado. O painel F demonstra um macrófago promovendo a fagocitose dos *debris* celulares. O painel G demonstra um axônio em processo de remielinização, com a membrana da célula de Schwann mielinizada envolvendo o axônio. Os painéis H e I demonstram axônios mielinizados regenerados após a lesão, com uma densa camada de mielina.

Continuação da legenda da Figura 17.

Escala: A, C, D e E – 2 μm , aumento de 8000 \times ; B – 5 μm , aumento de 5000 \times ; F – 1 μm , aumento de 25000 \times ; G e I – 0,5 μm , aumento de 50000 \times ; H – 100 nm, aumento de 150000 \times .

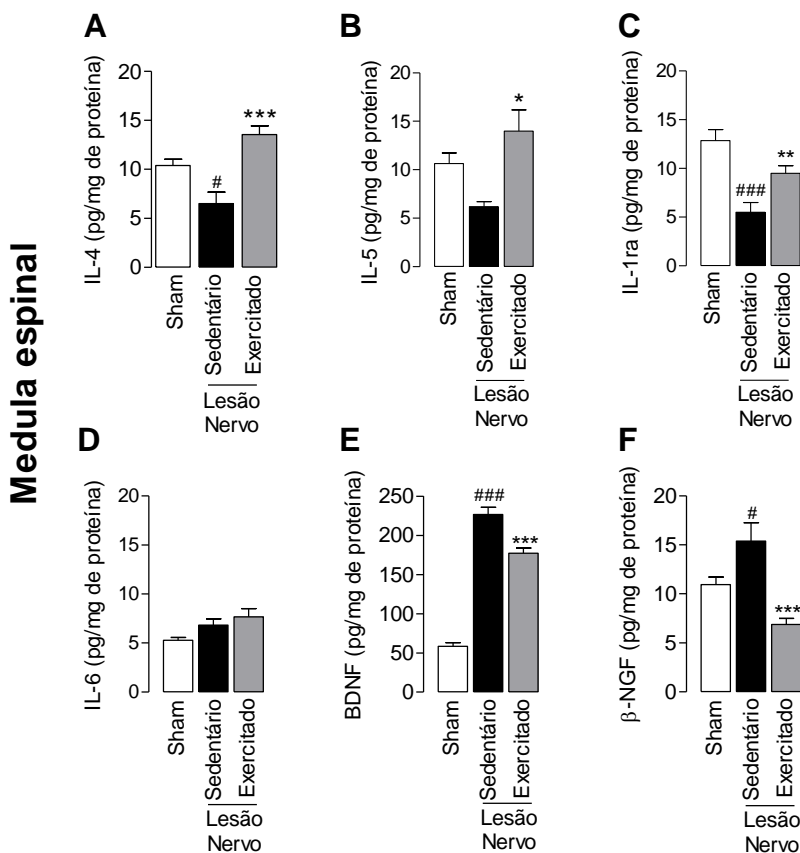
Fonte: A autora (2015).

5.1.8 Efeito do exercício físico nas concentrações das interleucinas IL-4, IL-5, IL-1ra e IL-6 e das neurotrofinas BDNF e β -NGF na medula espinal

A Figura 18 mostra que o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático em camundongos Swiss reduziu as concentrações das interleucinas anti-inflamatórias IL-4 ($P < 0,05$; Figura A) e IL-1ra ($P < 0,001$; Figura C), e aumentou significativamente as concentrações das neurotrofinas BDNF ($P < 0,001$; Figura E) e β -NGF ($P < 0,05$; Figura F) na medula espinal dos animais lesionados do grupo Sedentário quando comparados aos animais do grupo Sham, no 15º dia após a lesão. Por outro lado, o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo não alterou as concentrações da IL-5 e da IL-6 após a lesão no grupo Sedentário, em relação ao grupo Sham ($P > 0,05$; Figura B e D).

O exercício físico foi capaz de aumentar as concentrações das interleucinas anti-inflamatórias IL-4 ($P < 0,001$; Figura A), IL-5 ($P < 0,05$; Figura B) e IL-1ra ($P < 0,01$; Figura C), além de promover redução significativa das concentrações de BDNF ($P < 0,001$; Figura E) e β -NGF ($P < 0,001$; Figura F) na medula espinal de camundongos do grupo Exercitado, quando comparado aos animais do grupo Sedentário. Por outro lado, os animais do grupo Exercitado não demonstraram alterações nas concentrações da IL-6 após a lesão, em relação aos animais do grupo Sedentário ($P > 0,05$; Figura D).

Figura 18 - Efeito do exercício físico nas concentrações das interleucinas IL-4, IL-5, IL-1ra e IL-6 e das neurotrofinas BDNF e β -NGF na medula espinal



Legenda: Efeito do exercício físico sobre as concentrações das interleucinas IL-4 (painel A), IL-5 (painel B), IL-1ra (painel C), IL-6 (painel D) e das neurotrofinas BDNF (painel E) e β -NGF (painel F) na medula espinal de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão no nervo. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5-8 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. # $P < 0,05$ e ### $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sham; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo Sedentário.

Fonte: A autora (2015).

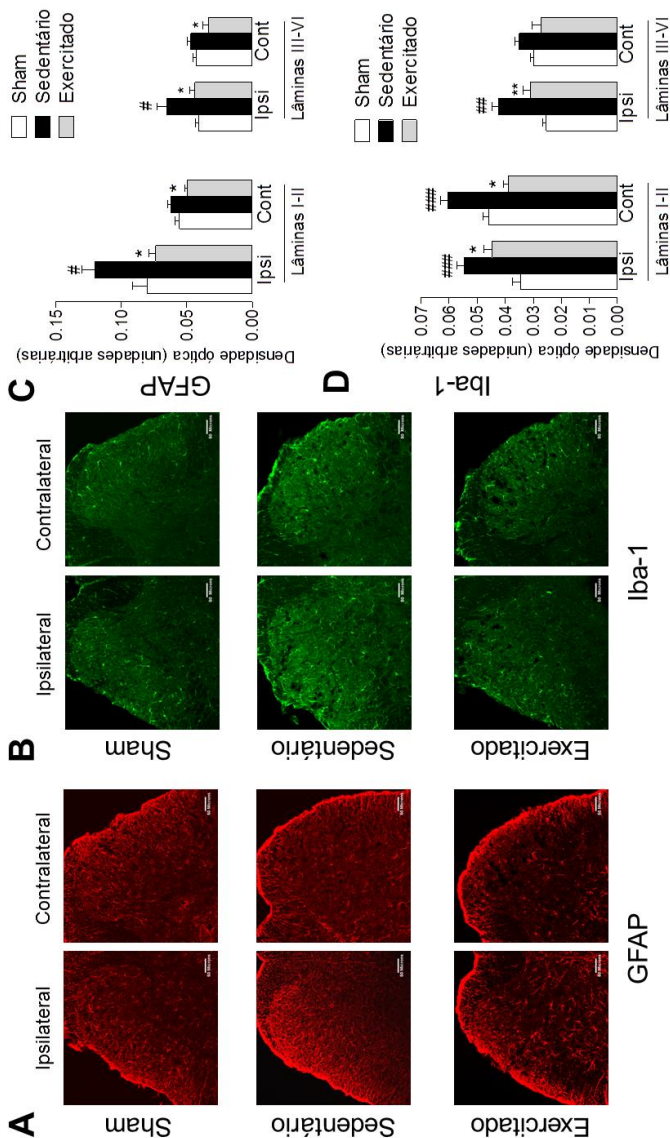
5.1.9 Efeito do exercício físico na reatividade de células gliais no corno dorsal da medula espinal

Visto que a cirurgia de esmagamento do nervo isquiático causou hiperalgesia mecânica, bem como o aumento das concentrações de citocinas e neurotrofinas que promovem a reatividade de células gliais, avaliou-se, através de imunistoquímica, se a lesão por esmagamento do nervo e o tratamento com exercício físico poderiam alterar a atividade de astrócitos (imunomarcados com GFAP) e microglia (imunomarcados com Iba1) no corno dorsal da medula espinal, representados através das fotomicrografias confocais da imunofluorescência na Figura 19A e B, respectivamente.

A quantificação da imunofluorescência demonstrou que o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático no grupo Sedentário promoveu aumento da imunomarcagem de GFAP no lado ipsilateral à lesão, nas lâminas superficiais (I-II) e profundas (III-VI) do corno dorsal da medula espinal, quando comparados aos animais do grupo Sham ($P < 0,05$; Figura C). Do mesmo modo, ocorreu aumento da imunomarcagem de Iba1, tanto no lado ipsilateral quanto contralateral à lesão nas lâminas superficiais (I-II) ($P < 0,001$) e no lado ipsilateral à lesão, nas lâminas profundas (III-VI) ($P < 0,01$) do corno dorsal da medula espinal nos animais do grupo Sedentário, quando comparados aos animais do grupo Sham (Figura 19D).

Duas semanas de exercício físico, iniciadas após a lesão do nervo isquiático, promoveram redução da imunomarcagem de GFAP, tanto do lado ipsilateral quanto contralateral à lesão, nas lâminas superficiais (I-II) e profundas (III-VI) do corno dorsal da medula espinal, em animais do grupo Exercitado, quando comparados aos animais do grupo Sedentário ($P < 0,05$; Figura C). Além disso, o exercício físico reduziu a imunomarcagem de Iba1, tanto do lado ipsilateral quanto contralateral à lesão, nas lâminas superficiais (I-II) ($P < 0,05$), e também no lado ipsilateral das lâminas profundas (III-VI) ($P < 0,01$) do corno dorsal da medula espinal, de animais do grupo Exercitado, quando comparados aos animais do grupo Sedentário (Figura D).

Figura 19 - Efeito do exercício físico na reatividade de células gliais no corno dorsal da medula espinal e quantificação da imunomarcação de GFAP e Iba1



Legenda: Imunofluorescência do corno dorsal da medula espinal de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão traumática do nervo isquiático, demonstrando o efeito do exercício físico

Continuação da legenda da Figura 19.

na reatividade astrocitária (GFAP) e microglial (Iba1). Fotomicrografias confocais das secções transversas da medula espinal de camundongos imunomarcados para GFAP (painel A, imunomarcção em vermelho) e Iba1 (painel B, imunomarcção em verde). Os painéis C e D indicam a quantificação da imunoreatividade de astrócitos e microglia, respectivamente, nas lâminas I-II e III-IV no lado ipsilateral à lesão (Ipsi) e contralateral à lesão (Cont). Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-6 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo Sham; * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sedentário. Escala: 50 μ m. Aumento 20x.

Fonte: A autora (2015).

5.2 PARTE II - PAPEL DAS MONOAMINAS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DO EXERCÍCIO FÍSICO APÓS A LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO

5.2.1 Papel do sistema serotoninérgico no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico

Primeiramente, nossos dados demonstrados anteriormente evidenciaram que a hiperalgesia mecânica causada pelo procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático, bem como o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico foram reproduzidos nas avaliações do 5º ao 14º dia após a lesão, neste experimento. Os animais pré-tratados com salina no grupo Salina/Sedentário, aumentaram a frequência de retirada da pata ao filamento de von Frey, quando comparados aos animais do grupo Salina/Sham ($P < 0,001$; Figura 20A), apontando um quadro de hiperalgesia mecânica. Novamente, foi demonstrado o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, uma vez que o grupo Salina/Exercitado reduziu significativamente a resposta de retirada da pata ao estímulo mecânico em comparação aos animais do grupo Salina/Sedentário ($P < 0,001$; Figura A).

Para testar o papel da 5-HT no efeito anti-hiperalgésico produzido pelo exercício físico, utilizou-se o pré-tratamento dos animais exercitados com PCPA, o qual inibe sistemicamente a síntese de 5-HT. A Figura A indica que o pré-tratamento de camundongos com PCPA preveniu significativamente o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico no grupo PCPA/Exercitado quando comparado ao grupo

(Salina/Exercitado) nos dias 5 ($P < 0,01$), 7 ($P < 0,01$) e 14 ($P < 0,001$) após a lesão no nervo (Figura A).

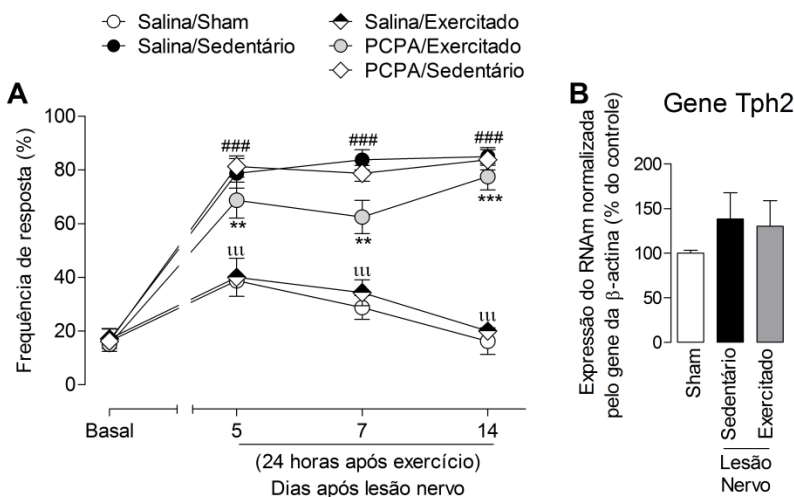
A Figura 21A demonstra que as concentrações de 5-HT foram maiores nos animais do grupo Salina/Sedentário, quando comparados aos animais do grupo Salina/Sham ($P < 0,05$), na medula espinal. O exercício físico não alterou as concentrações de 5-HT na medula espinal, as quais estavam maiores após a lesão no nervo, ou seja, não ocorreu diferença significativa nas concentrações de 5-HT entre os grupos Salina/Exercitado e Salina/Sedentário ($P > 0,05$). Por outro lado, as concentrações de 5-HT no tronco encefálico dos camundongos do grupo Salina/Sedentário foram significativamente menores em comparação aos animais do grupo Salina/Sham ($P < 0,05$). De modo interessante, o grupo Salina/Exercitado demonstra maior concentração de 5-HT comparando-se ao grupo Salina/Sedentário ($P < 0,001$) (Figura C). Na medula espinal e no tronco encefálico dos camundongos do grupo PCPA/Exercitado houve uma evidente redução nas concentrações de 5-HT em comparação ao grupo Salina/Exercitado ($P < 0,001$) (Figura 21A).

Em relação às concentrações do metabólito da 5-HT, o 5-HIAA (Figura 21B), não foi observado diferença entre o grupo Salina/Sedentário comparando-se aos animais do grupo Salina/Sham ($P > 0,05$), na medula espinal. O exercício físico também não alterou este parâmetro no grupo Salina/Exercitado em relação ao grupo Salina/Sedentário ($P > 0,05$). No tronco encefálico, assim como ocorreu com a 5-HT, as concentrações de 5-HIAA foram maiores no grupo Salina/Sedentário em comparação com o grupo Salina/Sham ($P < 0,01$). O conteúdo de 5-HIAA no grupo Salina/Exercitado foi significativamente maior em comparação ao grupo Salina/Sedentário ($P < 0,01$), atingindo concentrações semelhantes ao grupo Salina/Sham (Figura 21B). Além disso, o conteúdo de 5-HIAA foi menor no grupo PCPA/Exercitado quando comparado ao grupo Salina/Exercitado na medula espinal ($P < 0,05$) e no tronco encefálico ($P < 0,001$) (Figura B).

A Figura 21C demonstra que a taxa de *turnover* de 5-HT (5-HIAA/5-HT) foi significativamente maior no grupo Salina/Exercitado comparando-se ao grupo PCPA/Exercitado ($P < 0,05$) na medula espinal, o qual indica um aumento do metabolismo de 5-HT após o tratamento com o exercício físico. Entretanto, no tronco encefálico o grupo Salina/Exercitado apresentou uma redução na razão 5-HIAA/5-HT em comparação ao grupo Salina/Sedentário ($P < 0,05$) e PCPA/Exercitado ($P < 0,05$), indicando menor *turnover* de 5-HT no tronco encefálico após o tratamento com o exercício físico (Figura 21C).

Devido ao maior conteúdo de 5-HT no tronco encefálico, em camundongos exercitados, avaliou-se uma possível relação com o aumento da expressão da enzima Tph2. Entretanto, a análise de PCRq demonstrou que não ocorreu diferença estatística significativa na expressão do RNAm da enzima Tph2 entre os grupos ($P = 0,51$; Figura B).

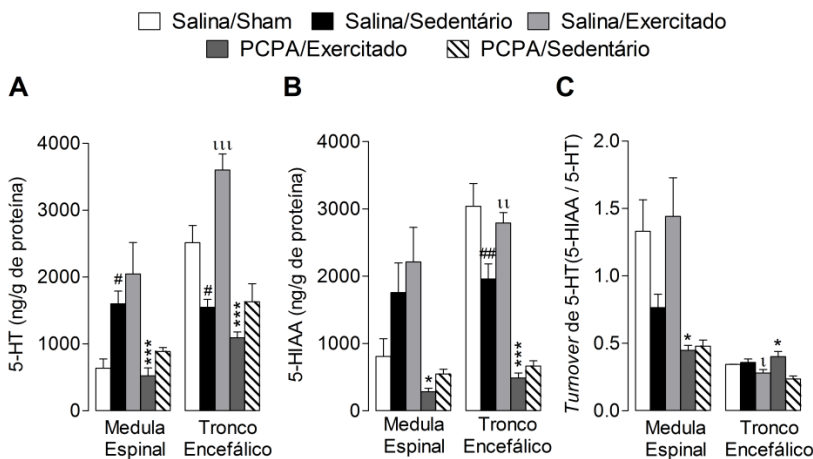
Figura 20 - Papel do sistema serotoninérgico no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico



Legenda: Papel do sistema serotoninérgico no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico em camundongos Swiss. A avaliação da pelo teste de von Frey (painel A) demonstrou que a redução da hiperalgésia mecânica induzida pelo exercício físico foi prevenida pelo pré-tratamento dos animais com PCPA do 5º ao 14º dia após a lesão. A análise da expressão do RNAm da enzima triptofano hidroxilase 2 (Tph2) no tronco encefálico demonstrou que a lesão do nervo ou o tratamento com o exercício físico após a lesão não alteraram a expressão do gene da Tph2 (painel B). Os dados são expressos como média \pm EPM de 5-8 animais por grupo comparados estatisticamente através de ANOVA de duas vias com medidas repetidas (A), seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ou ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls (B). ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo Salina/Sham; ⁱⁱⁱ $P < 0,001$ quando comparado ao grupo Salina/Sedentário e ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo PCPA/Exercitado.

Fonte: A autora (2015).

Figura 21 – Concentrações de 5-HT, do seu metabólito 5-HIAA e taxa de *turnover* de 5-HT após a lesão por esmagamento do nervo isquiático e o tratamento com exercício físico.



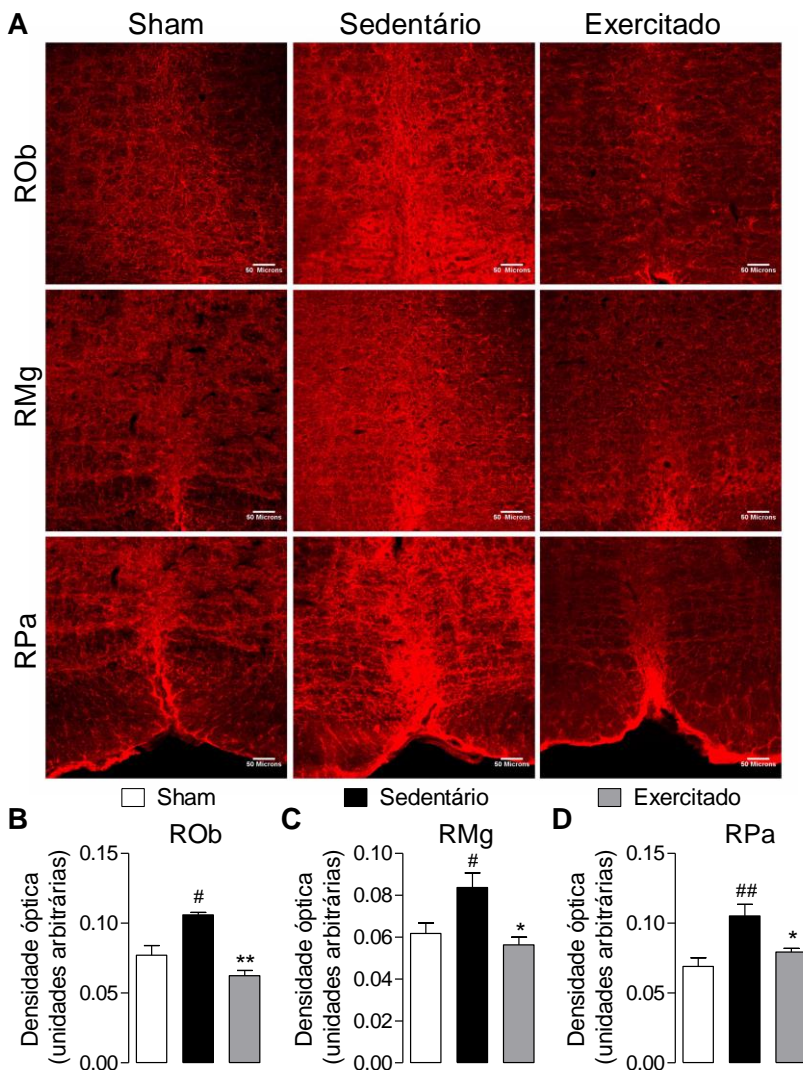
Legenda: Os painéis C e D demonstram os resultados da análise por HPLC das concentrações de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA, respectivamente, na medula espinal e tronco encefálico. O exercício físico aumentou as concentrações de 5-HT e 5-HIAA no tronco encefálico de animais lesionados, o que foi prevenido pelo pré-tratamento com PCPA. O painel E demonstra a taxa de *turnover* de 5-HT, detectada através da razão de 5-HIAA/5-HT. O exercício físico inibiu significativamente o aumento do *turnover* de 5-HT no tronco encefálico de camundongos submetidos à lesão do nervo isquiático. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5-8 animais por grupo comparados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. [#] $P < 0,05$ e ^{##} $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Salina/Sham; ^l $P < 0,05$, ^{ll} $P < 0,01$ e ^{lul} $P < 0,001$ quando comparado ao grupo Salina/Sedentário e ^{*} $P < 0,05$ e ^{***} $P < 0,001$ quando comparado ao grupo PCPA/Exercitado.

Fonte: A autora (2015).

5.2.2 Efeito do exercício físico na imunomarcção dos SERT nos núcleos caudais da rafe bulbar

Desde que o sistema serotoninérgico do tronco encefálico pode estar envolvido no efeito do exercício físico, considerando que ocorreu aumento das concentrações de 5-HT após o exercício, foi avaliado se a lesão no nervo isquiático, nos animais submetidos ao exercício físico ou mantidos sedentários, poderia modificar a densidade dos SERT nos núcleos caudais da rafe bulbar. A Figura 22A apresenta as fotomicrografias com imagens representativas da marcação imunoistoquímica para os SERT nos núcleos RMg, Rob e RPa em camundongos do grupo Sham, Sedentário e Exercitado. As análises quantitativas mostraram aumento na densidade da imunomarcção para os SERT nos núcleos ROb ($P < 0,01$), RMg ($P < 0,05$) e RPa ($P < 0,05$) no grupo Sedentário em comparação ao grupo Sham (Figura 22B, C e D, respectivamente). De modo interessante, no grupo Exercitado foi reduzida significativamente a densidade de marcação para os SERT em todos os núcleos caudais da rafe bulbar (ROb, $P < 0,05$; RMg, $P < 0,05$ e RPa, $P < 0,05$; Figura 22B, C e D, respectivamente) comparando-se ao grupo Sedentário e ainda, foi capaz de normalizar a densidade de marcação para os SERT não demonstrando diferença estatística significativa em comparação aos animais do grupo Sham.

Figura 22 - Efeito do exercício físico na imunomarcação dos SERT nos núcleos caudais da rafe



Legenda: Imunofluorescência dos núcleos caudais da rafe de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão traumática do nervo isquiático, demonstrando o efeito do exercício físico na imunomarcação para transportadores de serotonina (SERT).

Continuação da legenda da Figura 22.

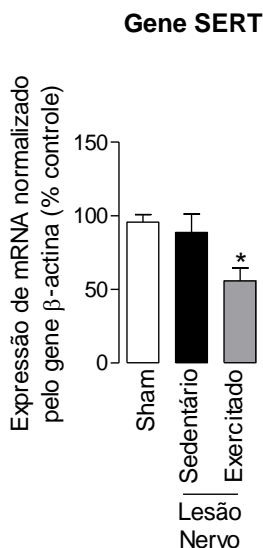
Fotomicrografias confocais das secções transversas do bulbo de camundongos imunomarcados para os SERT, no núcleo Obscuro da Rafe (ROb), Magno da Rafe (RMg) e Pálido da Rafe (RPa) (painel A). Os painéis C, D e E indicam a quantificação da imunoreatividade dos SERT nos núcleos Rob, RMg e RPa, respectivamente, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sham; * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sedentário. Escala: 50 μm . Aumento 20x.

Fonte: A autora (2015).

5.2.3 Efeito do exercício físico na expressão gênica dos SERT no tronco encefálico

Para confirmar e estender os dados relacionados à redução da densidade de marcação para os SERT nos núcleos caudais da rafe após a lesão no nevo e o tratamento com exercício físico, quantificou-se a expressão dos RNAm dos SERT no tronco encefálico através de PCRq. A Figura 23 destaca que não ocorreu diferença significativa na expressão do RNAm dos SERT entre os grupos Sham e Sedentário ($P > 0,05$). No entanto, os camundongos do grupo Exercitado apresentaram redução na expressão do RNAm dos SERT quando comparados aos animais do grupo Sedentário ($P < 0,05$).

Figura 23 - Efeito do exercício físico na expressão gênica dos SERT no tronco encefálico



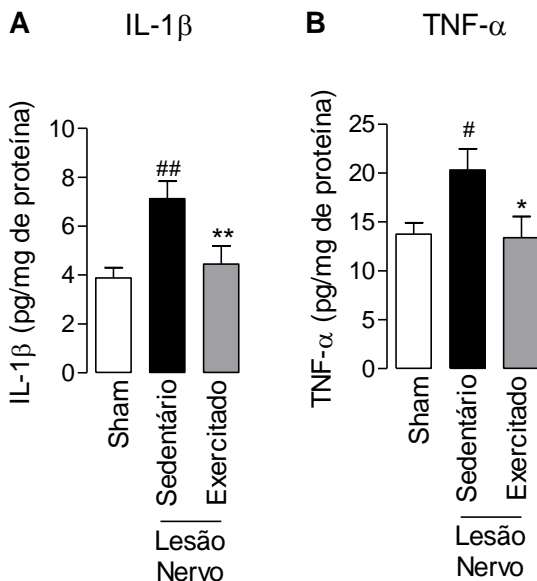
Legenda: Efeito do exercício físico sobre a expressão do RNAm do transportador de serotonina (SERT) no tronco encefálico de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão no nervo. Os dados são expressos como média \pm EPM de 7 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Sedentário.

Fonte: A autora (2015).

5.2.4 Efeito do exercício físico nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no tronco encefálico

A fim de elucidar um possível mecanismo para a redução dos SERT nos núcleos caudais da rafe, após duas semanas de exercício físico, avaliamos as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no tronco encefálico de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado. A Figura 24 demonstra que no 15º dia após a lesão ocorreu um aumento significativo nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β ($P < 0,01$; Figura 24A) e TNF- α ($P < 0,05$; Figura 24B) no tronco encefálico de animais do grupo Sedentário, quando comparados aos animais do grupo Sham. No entanto, duas semanas de exercício físico foram capazes de reduzir as concentrações de IL-1 β ($P < 0,01$) e TNF- α ($P < 0,05$) nos animais do grupo Exercitado, quando comparados aos animais do grupo Sedentário. Além disso, o exercício físico normalizou as concentrações de IL-1 β e TNF- α , não demonstrando diferença significativa entre os animais do grupo Exercitado e Sham ($P > 0,05$).

Figura 24 - Efeito do exercício físico nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no tronco encefálico



Legenda: Efeito do exercício físico nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (painel A) e TNF- α (painel B) no tronco encefálico de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão no nervo. Os dados são expressos como média \pm EPM de 6-8 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sham; * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sedentário.

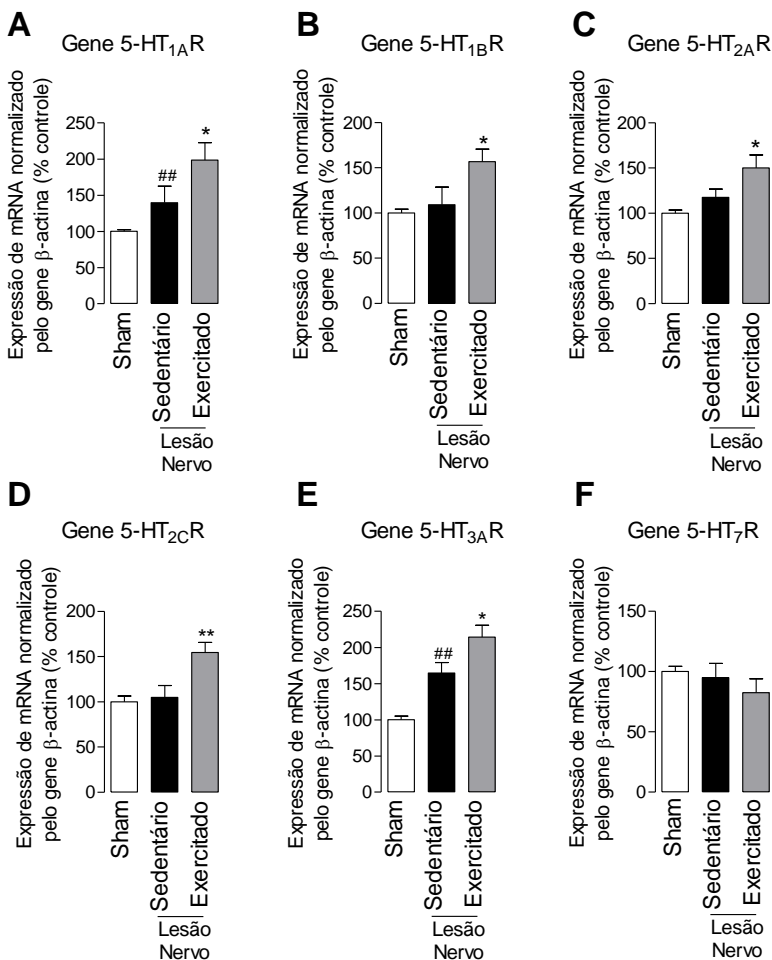
Fonte: A autora (2015).

5.2.5 Efeito do exercício físico na expressão gênica de receptores de 5-HT no tronco encefálico

Considerando que, ocorreram reduções nas concentrações de 5-HT e aumento na densidade dos SERT no tronco encefálico após a lesão no nervo, e o exercício físico restabelece estas alterações, avaliamos também a expressão gênica dos receptores de 5-HT no tronco encefálico por PCRq (Figura 25). Assim, foi observado um aumento na expressão do RNAm dos receptores 5-HT_{1A}R ($P < 0,01$; Figura 25Figura A) e 5-HT_{3A}R ($P < 0,01$; Figura 25Figura E) no 15º dia após a lesão do nervo nos animais do grupo Sedentário, quando comparados aos animais do grupo Sham. No entanto, não foram observadas alterações na expressão gênica dos receptores 5-HT_{1B}R, 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2C}R e 5-HT₇R ($P > 0,05$), quando comparados os grupos Sedentário vs. Sham.

A realização de exercício físico, por duas semanas, promoveu o aumento da expressão do RNAm dos receptores 5-HT_{1A}R ($P < 0,05$), 5-HT_{1B}R ($P < 0,05$), 5-HT_{2A}R ($P < 0,05$), 5-HT_{2C}R ($P < 0,01$) e 5-HT_{3A}R ($P < 0,05$) nos animais do grupo Exercitado, comparando-se aos animais do grupo Sedentário (Figura 25A, B, C, D e E, respectivamente). Contudo, as análises de PCRq não demonstraram diferença significativa para expressão do RNAm do receptor 5-HT₇R (Figura 25F) entre os grupos avaliados ($P = 0,46$).

Figura 25 - Efeito do exercício físico na expressão gênica de receptores de 5-HT no tronco encefálico



Legenda: Efeito do exercício físico sobre a expressão do RNAm dos receptores: 5-HT_{1A}R (painel A), 5-HT_{1B}R (painel B), 5-HT_{2A}R (painel C), 5-HT_{2C}R (painel D), 5-HT_{3A}R (painel E) e 5-HT₇R (painel F) no tronco encefálico de camundongos Swiss dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, no 15º dia após a lesão no nervo. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. ^{##} $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sham; ^{*} $P < 0,05$ e ^{**} $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sedentário.

Fonte: A autora (2015).

5.2.6 Papel do sistema catecolaminérgico no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico

No sétimo dia após a lesão, conforme os dados apresentados no item 5.1.2, os resultados obtidos com os grupos Salina/Sham, Salina/Sedentário e Salina/Exercitado foram novamente reproduzidos e confirmaram que o procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo isquiático produz uma intensa hiperalgesia mecânica nos animais do grupo Salina/Sedentário, quando comparados ao grupo Salina/Sham ($P < 0,001$; Figura 26A). Além disso, foi reproduzido o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, em que o grupo Salina/Exercitado reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica em comparação aos animais lesionados do grupo Salina/Sedentário ($P < 0,001$; Figura 26A).

Para testar o papel do sistema catecolaminérgico no efeito do exercício físico, no sétimo dia após a lesão no nervo, utilizou-se um pré-tratamento sistêmico agudo com o AMPT, para inibir a enzima Th e depletar as concentrações de NA e DA no SNC. As análises por HPLC confirmaram que o tratamento com AMPT antes do exercício (AMPT/Exercitado) reduziu o conteúdo de NA, na medula espinal ($P < 0,05$) e no tronco encefálico ($P < 0,05$), bem como a concentração de DHPG na medula espinal ($P < 0,05$), quando comparados aos animais do grupo Salina/Exercitado (Figura 26C e D, respectivamente). No entanto, a depleção das catecolaminas nos animais do grupo AMPT/Exercitado não preveniu o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico nas avaliações do decurso temporal (0,5, 1, 2 e 24 horas) após a sessão de tratamento com exercício físico, em comparação ao grupo Salina/Exercitado ($P > 0,05$; Figura 26A). Um grupo de animais sedentários pré-tratados com AMPT (AMPT/Sedentário) foi utilizado como controle para verificar o possível efeito *per se* do AMPT após a lesão no nervo; porém, não houve diferença estatística significativa em comparação ao grupo Salina/Sedentário ($P > 0,05$; Figura 26A).

Embora o pré-tratamento com o AMPT não tenha prevenido o efeito anti-hiperalgésico produzido pelo exercício físico, ocorreu um aumento significativo nas concentrações de NA no tronco encefálico de camundongos do grupo Salina/Exercitado em comparação aos animais do grupo Salina/Sedentário ($P < 0,05$, Figura 26C). Na medula espinal, não foi observada diferença significativa no conteúdo de NA entre os animais dos grupos Salina/Sham e Salina/Sedentário, ou Salina/Sedentário e Salina/Exercitado ($P > 0,05$; Figura 26C). Além disso, tanto na medula espinal, quanto no tronco encefálico não foi observado diferença significativa no conteúdo de DHPG entre os

animais dos grupos Salina/Sham e Salina/Sedentário ou Salina/Sedentário e Salina/Exercício ($P > 0,05$; Figura 26D). Como ocorreu um aumento no conteúdo de NA no tronco encefálico dos animais do grupo Salina/Exercitado, avaliamos através de PCRq se este aumento estava relacionado a maior expressão da enzima que converte DA em NA, a Dbh. A Figura 26F demonstra que não ocorreu diferença significativa ($P = 0,91$) na expressão do RNAm da Dbh entre os animais dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado.

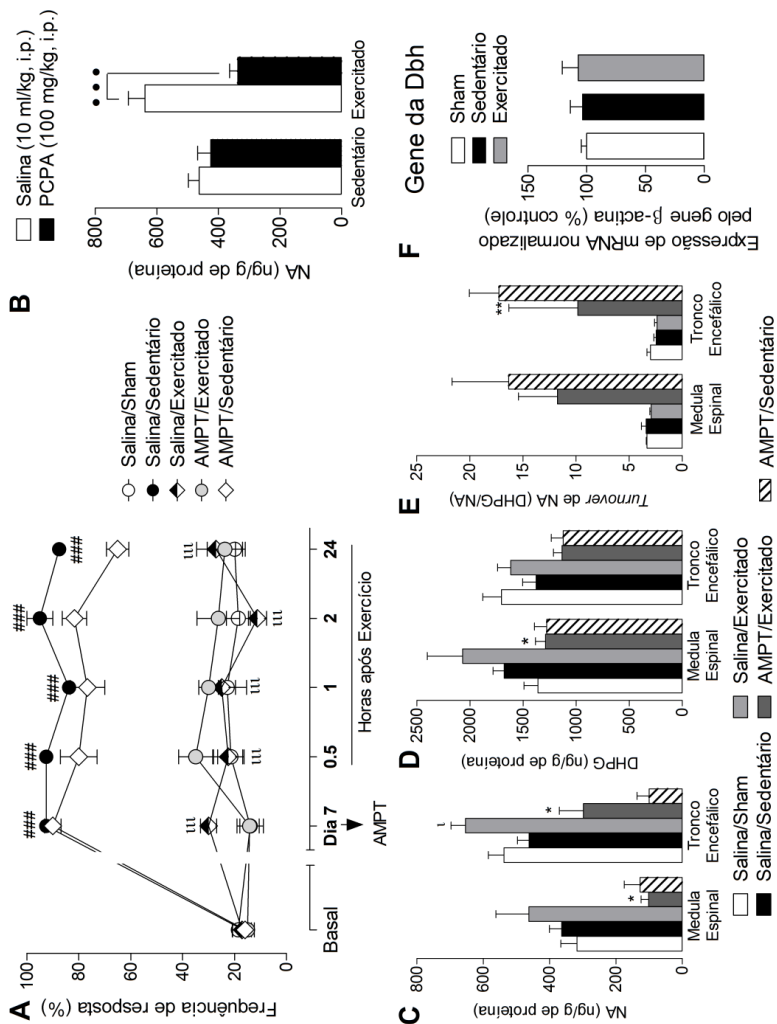
Para verificar a interação entre os sistemas catecolaminérgico e serotoninérgico, e observar se a redução da síntese de 5-HT pelo PCPA poderia interferir no conteúdo de NA no tronco encefálico, nós comparamos as análises por HPLC do conteúdo de NA de animais dos grupos Sedentário e Exercitado, pré-tratados com Salina ou PCPA. Assim, foi possível observar que não existe diferença significativa no conteúdo de NA entre os animais dos grupos Salina/Sedentário e PCPA/Sedentário ($P = 0,51$). No entanto, os animais do grupo PCPA/Exercitado demonstraram uma redução das concentrações de NA, quando comparados aos animais do grupo Salina/Exercitado ($P < 0,001$; Figura 26B).

O conteúdo de DA e seus metabólitos DOPAC e HVA no tronco encefálico e medula espinal também foram mensurados. A Figura 27 demonstrou que não ocorreu diferença significativa nos conteúdos de DA ($P = 0,64$; $P = 0,23$) e seus metabólitos, DOPAC ($P = 0,35$; $P = 0,17$) e HVA ($P = 0,48$; $P = 0,059$), na medula espinal e tronco encefálico, respectivamente, entre os grupos Salina/Sham vs. Salina/Sedentário ou Salina/Sedentário vs. Salina/exercitado (Figura 27 A, B e C, respectivamente). Os animais dos grupos AMPT/Exercitado ou AMPT/Sedentário, que foram pré-tratados com AMPT, demonstraram concentrações nos conteúdos de DA, DOPAC e HVA abaixo do limite de detecção do aparelho, e, portanto, nenhum valor para estes grupos foi plotado nos gráficos da Figura 27.

Os animais dos grupos Salina/Sham, Salina/Sedentário ou Salina/Exercitado não demonstraram diferença significativa na taxa de *turnover* total de DA ($HVA + DOPAC/DA$) na medula espinal ($P = 0,07$) e no tronco encefálico ($P = 0,24$) (Figura 27D), bem como no *turnover* sináptico de DA (HVA/DA) na medula espinal ($P = 0,57$) e no tronco encefálico ($P = 0,73$) (Figura 27E). No entanto, a razão DHPG/DA foi significativamente maior nos animais do grupo Salina/Exercitado, quando comparados aos animais do grupo Salina/Sedentário ($P < 0,05$) na medula espinal, indicando que o *turnover* pré-sináptico de DA foi maior nos animais submetidos ao

exercício físico, por outro lado, no tronco encefálico os grupos experimentais não demonstraram diferença significativa ($P = 0,11$) (Figura 27F).

Figura 26 - Papel do sistema catecolaminérgico no exercício físico após a lesão do nervo isquiático



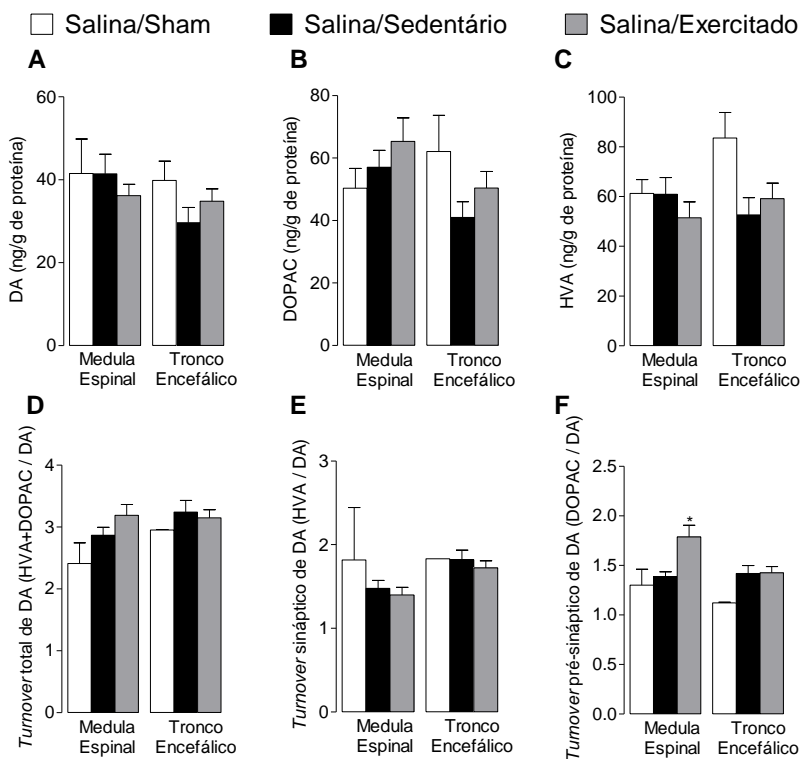
Legenda: Papel do sistema catecolaminérgico no exercício físico em camundongos Swiss. A avaliação pelo teste de von Frey (painel A) demonstrou que a redução da hiperalgesia mecânica induzida pelo exercício físico não foi revertida pelo pré-tratamento dos animais com AMPT no 7º dia após a lesão,

Continuação da legenda da Figura 26.

observado na avaliação temporal de 0,5 a 24 horas após o tratamento com exercício. A análise por HPLC da noradrenalina (NA) no tronco encefálico demonstrou a interação entre o sistema serotoninérgico e noradrenérgico (painel B). Camundongos exercitados pré-tratados com PCPA (PCPA/Exercitado) demonstraram uma redução das concentrações de NA no tronco encefálico quando comparados com camundongos do grupo Salina/Exercitado (painel B). Os painéis C e D demonstram a análise por HPLC das concentrações de NA e seu metabólito DHPG, respectivamente, na medula espinal e tronco encefálico. O exercício físico aumentou as concentrações de NA no tronco encefálico, o que foi revertido pelo pré-tratamento com AMPT nos animais exercitados. O painel E demonstra a taxa de *turnover* de NA, detectada através da razão de DHPG/NA. O pré-tratamento de camundongos exercitados com AMPT (AMPT/Exercitado) aumentou significativamente o *turnover* de NA no tronco encefálico, em relação aos animais do grupo Salina/Exercitado. A análise da expressão gênica da enzima dopamina beta hidroxilase (Dbh) no tronco encefálico dos animais dos grupos Sham, Sedentário e Exercitado, demonstra que não ocorre diferença estatística significativa entre os grupos. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5-8 animais por grupo comparados estatisticamente através de ANOVA de duas vias com medidas repetidas (A) seguidas pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ou ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls (B, C, D, E e F). *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo Salina/Exercitado; ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo Salina/Sham; ¹ $P < 0,05$ e ^{III} $P < 0,001$ quando comparado ao grupo Salina/Sedentário e * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo AMPT/Exercitado.

Fonte: A autora (2015).

Figura 27 - Efeito do exercício físico no conteúdo de DA e seus metabólitos no tronco encefálico e medula espinal



Legenda: A análise por HPLC dos conteúdos de DA (painel A), DOPAC (painel B) e HVA (painel C) na medula espinal e no encéfalo de camundongos dos grupos Salina/Sham, Salina/Sedentário e Salina/Exercitado, 15 dias após a lesão do nervo isquiático, demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos. A taxa de turnover total de DA (painel D), bem como o turnover sináptico de DA (painel E) não foram alteradas após a lesão e/ou o exercício físico. O turnover pré-sináptico de DA (painel F) foi maior nos camundongos do grupo Salina/Exercitado em relação ao grupo Salina/Sedentário (* $P < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-7 animais por grupo comparados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Student-Newman-Keuls.

Fonte: A autora (2015).

6 DISCUSSÃO

Embora alguns estudos tenham mostrado os efeitos positivos do exercício físico na esteira sobre a regeneração nervosa e a recuperação funcional após a lesão do SNP, seus efeitos na dor neuropática e os mecanismos envolvidos não estão bem elucidados (SABATIER et al., 2008; MARQUESTE et al., 2004; BYUN et al., 2005). Previamente nosso grupo de pesquisa demonstrou que o exercício físico de baixa intensidade após a lesão por esmagamento do nervo isquiático reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica; e também, reduziu as concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) no local da lesão e na medula espinal e do receptor de IL-6 (IL-6R) na medula espinal, após a lesão por esmagamento do nervo isquiático. Ademais, o exercício físico de baixa intensidade aumentou o número de axônios mielinizados promovendo a recuperação da função motora do nervo isquiático (BOBINSKI et al., 2011b). Neste trabalho, nós confirmamos e estendemos os resultados experimentais obtidos anteriormente, bem como, fornecemos novos subsídios neurobiológicos que apontam para importantes mecanismos envolvidos no efeito terapêutico do exercício físico no controle da dor neuropática e da regeneração nervosa periférica.

6.1 PARTE I – Papel das interações neuroimunes no efeito anti-hiperalgésico e neuroregenerativo do exercício físico após a lesão do nervo isquiático

A primeira parte deste trabalho evidenciou o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo exercício físico e elucidou parte dos seus mecanismos neurobiológicos periféricos e centrais, no modelo de lesão traumática por esmagamento do nervo isquiático, em camundongos. Os resultados mais relevantes foram: i) o tratamento com exercício físico reduziu a hiperalgesia mecânica após a lesão no nervo; ii) a infiltração de leucócitos no local da lesão no nervo é responsável por parte do seu efeito anti-hiperalgésico; iii) o tratamento com exercício físico aumentou as concentrações de IL-4 e IL-1ra no nervo isquiático; iv) a IL-4 aumentada nos animais exercitados é fundamental para o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico; v) o exercício físico promoveu a alteração fenotípica de macrófagos no local da lesão, do subtipo M1 para o subtipo M2_{a/c}, sendo a IL-4 essencial para esta alteração; vi) o

exercício físico aumentou as concentrações das neurotrofinas β -NGF e BDNF, bem como da proteína da mielina PMP22 no nervo isquiático; centralmente, na medula espinal, vii) o exercício físico aumentou as concentrações das citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-1ra, bem como reduziu as neurotrofinas β -NGF e BDNF; por fim, vii) o exercício físico reduziu a ativação das células gliais (microglia e astrócito) no corno dorsal da medula espinal.

6.1.1 Efeito anti-hiperalgésico do exercício físico

Os estudos sobre os mecanismos de dor neuropática claramente indicam que lesões nos nervos espinais levam ao desenvolvimento de mudanças acentuadas no sistema nervoso sensorial, o que a torna distinta de outros tipos de dor crônica, no qual o sistema sensorial permanece intacto. Estas alterações incluem o aparecimento de novos receptores e canais na membrana de neurônios em degeneração ou regeneração, mudanças no processamento do sinal nociceptivo no SNP e SNC, bem como novas conexões anatômicas aferentes. Estas alterações no sistema sensorial levam à dor neuropática e seus sinais e sintomas característicos, como alodinia e hiperalgesia mecânica e térmica, além da dor espontânea (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

Acometidos por esses sinais e sintomas, os indivíduos com dor neuropática deixam de se exercitar, de realizar tarefas domésticas, de manter atividades sociais e, até mesmo, de ter um sono normal, afetando o relacionamento com familiares e amigos e, muitas vezes, levando a outras comorbidades como ansiedade e depressão (SINISCALCO; ROSSI; MAIONE, 2007). Evidências sugerem que pacientes com dor neuropática são menos responsivos a procedimentos analgésicos convencionais e, devido a isso, medicamentos como antidepressivos e opioides muitas vezes são coadministrados na busca de um tratamento eficaz (DWORKIN et al., 2007).

Modelos de lesões do nervo isquiático têm sido amplamente utilizados nas duas últimas décadas, principalmente para avaliar o retorno da função motora em estudos de regeneração do SNP, no entanto, apenas recentemente tem-se dado ênfase à avaliação da dor neuropática que se desenvolve após esta lesão (DECOSTERD et al., 2002; NAIK et al., 2008; COBIANCHI et al., 2010). Assim, nossos resultados demonstraram que a lesão do nervo isquiático levou ao desenvolvimento de um quadro de hiperalgesia mecânica crônica, que se desenvolveu a partir do terceiro dia, prolongando-se por

aproximadamente 28 dias após a lesão. A fim de confirmar e estender os resultados obtidos anteriormente a respeito do efeito terapêutico do exercício físico no controle da dor neuropática (BOBINSKI et al., 2011b), utilizou-se o modelo de lesão por esmagamento do nervo isquiático e avaliou-se a hiperalgesia mecânica pelo teste de von Frey e, posteriormente, analisou-se o possível mecanismo de ação anti-hiperalgésico do exercício físico utilizando esta ferramenta.

Os resultados apresentados neste estudo confirmam o importante e consistente efeito anti-hiperalgésico produzido pelo exercício físico após a lesão por esmagamento do nervo isquiático, impedindo a instalação do quadro de hiperalgesia mecânica, sintoma característico de dor neuropática. Sabe-se que a dor, em humanos, é uma experiência subjetiva que envolve tanto dimensões sensório-discriminativas quanto emocionais, com sinais processados em diferentes regiões do encéfalo, como o córtex somatosensorial primário, tálamo, córtex cingulado anterior e amígdala, além da medula espinal (OSSIPOV, 2012; NEUGEBAUER et al., 2009, 2004; OHARA; VIT; JASMIN, 2005).

O teste de von Frey é um dos índices mais comuns de nocicepção estudado em roedores. Este teste avalia a sensibilidade mecânica cutânea, que é mensurada a partir do reflexo de retirada da pata à aplicação do filamento de von Frey na superfície plantar. No entanto, a ação de retirada da pata é um reflexo medular, o que revela muito pouco sobre aspectos cruciais cognitivos e emocionais da dor em humanos, os quais são mediados corticalmente (MENDELL, 2011; WIECH; PLONER; TRACEY, 2008). Os testes operantes, em que o animal pode escolher evitar ou escapar do estímulo que lhe causa dor, estão sendo cada vez mais utilizados como medidas do efeito de terapias analgésicas sobre as dimensões afetivas e aversivas da dor (EWAN; MARTIN, 2013; NAVRATILOVA et al., 2013).

Pelos motivos supracitados, a fim de estender os resultados e demonstrar o consistente efeito anti-hiperalgésico do exercício físico após a lesão por esmagamento do nervo isquiático, utilizou-se, além do teste de von Frey, o teste do paradigma fuga/esquiva. Este teste fornece um índice promissor do estado emocional relacionado à dor, já que consiste em uma mensuração operante, a qual revela claramente a aversividade acessível cognitivamente do estado de “dor” em animais (NAVRATILOVA et al., 2013). No presente estudo, observamos que a lesão do nervo isquiático reduziu o tempo que o animal permaneceu no lado direito da caixa de avaliação, onde estava sendo estimulado com o filamento de von Frey na superfície plantar da pata direita, a qual havia sido lesionada, demonstrando um comportamento de fuga/esquiva do

estímulo aversivo. Este comportamento ocorreu no terceiro dia, prolongando-se até o último dia de avaliação, no décimo quarto dia após a lesão. Os animais do grupo Sham, os quais não foram submetidos ao esmagamento do nervo, não demonstraram preferência por nenhum lado da caixa de avaliação, demonstrando que o comportamento de fuga/esquiva é realmente gerado para o alívio do estímulo aversivo que lhe causa dor após a lesão.

Por outro lado, foi observado que os animais tratados com exercício físico apresentaram uma redução do comportamento de fuga/esquiva, permitindo que estes animais permanecessem mais tempo do lado direito da caixa quando comparado ao grupo de animais lesionados sedentários. Isso é uma evidência de que o córtex pode reduzir a dor por interromper a transmissão da informação nociva ainda na medula espinal, ativando sistemas inibitórios do controle descendente da dor, como o serotoninérgico, localizados no tronco encefálico, e o exercício físico poderia facilitar esta ativação (OHARA; VIT; JASMIN, 2005).

No presente estudo também foi realizado o teste do campo aberto, o qual é convencionalmente utilizado para avaliar a “emocionalidade” em modelos de depressão em ratos e camundongos (COLLA et al., 2014; EYSENCK, 1960). Geralmente, neste teste, os animais com uma maior reatividade emocional deambulam menos e defecam mais (SUDAK; MAAS, 1964a, b). Neste trabalho, foi utilizado o teste do campo aberto como uma medida de locomoção dos animais. Relacionou-se a redução da atividade locomotora espontânea dos animais a um comportamento gerado pelo aumento da dor. De fato, foi observado que os camundongos que tiveram o nervo isquiático lesionado e permaneceram sedentários, deambularam menos em relação aos animais que não foram lesionados. No entanto, o exercício físico foi capaz de restabelecer a atividade locomotora espontânea dos animais com lesão do nervo isquiático. A dor espontânea é particularmente difícil de avaliar em roedores, principalmente em modelos de dor persistente. Contudo, se o animal está realmente sentindo dor espontânea, semelhante aos seres humanos que experienciam dor neuropática, isso deve ter um impacto sobre as atividades de vida diária do animal e sobre seu estado afetivo (KUPERS et al., 1992; D’ALMEIDA et al., 1999).

Em camundongos, pouco se sabe a respeito da influência da dor espontânea em mudanças no comportamento cotidiano como o sono, a alimentação, as interações sociais, o comportamento sexual e a locomoção (MARTIN; TUTTLE; MOGIL, 2014; FARMER et al.,

2014). Alguns estudos revelaram resultados conflitantes, como por exemplo, se a dor relacionada à lesão em nervos espinhais promove ou não comportamentos relacionados à ansiedade (HASNIE et al., 2007; NARITA et al., 2006a, b). Um estudo utilizando um modelo de constrição crônica do nervo isquiático revelou que não ocorre nenhuma mudança nas atividades da vida diária dos camundongos, no entanto, este estudo encontrou alterações no estado afetivo dos animais, com redução do tempo gasto nas interações sociais e também um comportamento característico de ansiedade (BENBOUZID et al., 2008). No presente estudo, foi possível observar que o exercício físico foi capaz de reduzir a dor neuropática e também as suas consequências, que resultam em alteração da atividade locomotora, tendo em vista, que ele restabeleceu a atividade de deambulação espontânea e, simultaneamente, a atividade exploratória, que são comportamentos naturais do cotidiano dos camundongos.

6.1.2 Efeito do exercício físico nas interações neuroimunes

Um importante processo no mecanismo de desenvolvimento da dor neuropática diz respeito às interações neuroimunes. A lesão no nervo induz a infiltração e a ativação de células do sistema imunológico, não somente no coto distal à lesão, mas também no GRD e medula espinal e a consequente ativação de mecanismos celulares e moleculares que antecedem a regeneração axonal é notadamente influenciada pelas interações neuroimunes (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011; BROWN; LUNN; PERRY, 1992).

A maioria dos estudos têm se centrado nas propriedades que aumentam a dor nas interações neuroimunes, destacando seus efeitos prejudiciais na neuropatia (TAKAHASHI et al., 2011). No entanto, leucócitos, como macrófagos e linfócitos, podem estimular a reparação tecidual e a recuperação da função motora após a lesão de nervo periférico ou da medula espinal, o que é atribuído, principalmente, à remoção de *debris* do tecido e a produção de neurotrofinas (PERRY; BROWN, 1992). De fato, Dahlin (1995) destacou o papel crucial das células do sistema imunológico na regeneração axonal, demonstrando que a prevenção da infiltração destas células prejudica o crescimento dos axônios do nervo isquiático lesionado. Outro estudo, com o uso de animais transgênicos, demonstrou que a prevenção da infiltração de leucócitos no local da lesão gera um prejuízo acentuado na regeneração axonal e recuperação da função locomotora por semanas após a lesão do

nervo isquiático. Este estudo também revelou que células de origem mieloides são responsáveis pelo *clearance* da mielina em degradação, síntese de neurotrofinas, formação e manutenção de vasos sanguíneos no sítio da lesão (BARRETTE et al., 2008).

Pautando-se nessas informações, com o objetivo de avaliar diretamente a função dos leucócitos que migram para o local da lesão, no presente estudo, foi bloqueado a migração destas células, através da utilização do inibidor das selectinas P e L, a fucoidina, a qual impede o rolamento de leucócitos, reduzindo o seu número no sítio inflamatório (STEIN, 1995). Assim, foi possível observar que o pré-tratamento dos animais com fucoidina reduziu o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, demonstrando que este efeito é, em parte, mediado pela migração de leucócitos para o local da lesão. Neste sentido, é conhecido que células do sistema imunológico contendo opioides migram para locais inflamados, onde liberam β -endorfina, as quais ativam os receptores opioides periféricos neuronais, inibindo a dor (STEIN, 1995).

Os leucócitos são importante fonte de opioides endógenos locais e tem sido demonstrado que células do sistema imunológico que produzem peptídeos opioides utilizam moléculas de adesão (por exemplo, selectinas P e L, molécula de adesão intracelular-1 [ICAM-1] e integrinas $\alpha 4$ e $\beta 2$) e quimiocinas (por exemplo, quimiocinas C-X-C motif ligante 1/2/3 [CXCL1/2/3]) para se acumular no tecido periférico inflamado (MACHELSKA, 2011). Portanto, o uso da fucoidina poderia impedir que essas células que contêm opioides migrassem para o local da lesão e liberassem opioides, promovendo seu efeito anti-hiperalgésico; tal resposta poderia ser estimulada pelo exercício físico. Além disso, a inibição do rolamento de leucócitos reduz a diapedese de monócitos que irão se diferenciar em macrófagos e migrar para o local da lesão. Estas células, por sua vez, irão promover uma rápida remoção dos *debris* de mielina, os quais contêm inibidores do crescimento dos axônios que podem prejudicar o processo de regeneração.

A infiltração de células do sistema imunológico em resposta à lesão do nervo leva a subsequente produção e secreção de mediadores pró-inflamatórios, os quais estão envolvidos na inflamação e remodelamento do tecido, após a lesão (MAEDA et al., 2009; KAWASAKI et al., 2008). Neste trabalho, foi demonstrado que a realização de duas semanas de exercício físico de baixa intensidade promoveu o aumento das concentrações das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-1ra no nervo isquiático, em relação aos animais sedentários, as quais haviam sido reduzidas após a lesão. Nesse contexto, é crescente o número de evidências que demonstram a importância do balanço na

secreção e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias durante a resposta inflamatória, sendo que o aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias pode exacerbar a inflamação, enquanto que o aumento da concentração de citocinas anti-inflamatórias e/ou redução de citocinas pró-inflamatórias podem levar a resolução da inflamação (WATKINS; MAIER, 2002). De fato, muitas citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1ra modulam os eventos imunológicos e inflamatórios por inibir a produção e a ação de citocinas pró-inflamatórias e também por reduzir ou inibir a hipersensibilidade à dor (MOALEM; TRACEY, 2006; THACKER et al., 2007).

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória com um vasto papel biológico em diversos processos, tais como: proliferação de células T, estimulação de células B, ativação de macrófagos, inflamação crônica e reparo tecidual (HERSHEY et al., 1997; WILLS-KARP; FINKELMAN, 2008). A ativação do receptor tipo I de IL-4 (IL-4R-I), expresso em linhagens de células hematopoiéticas linfoides (células T e B) e mieloides (monócitos, macrófagos e fibroblastos), induz a ativação da via da JAK 1/3 e do sinal transdutor e ativador de transcrição 6 (STAT6); além disso, está envolvido na regulação da maturação e da proliferação de células Th2 e na síntese de IgE pelas células B. O receptor tipo II de IL-4 (IL-4R-II) é expresso em células hematopoiéticas de linhagem mieloides e em células não hematopoiéticas (células do músculo liso e epiteliais), podendo se ligar tanto na IL-4 quanto na IL-13, também levando a via de ativação da STAT6 (WILLS-KARP; FINKELMAN, 2008).

Deste modo, destaca-se o papel da IL-4 no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, através da utilização de animais IL-4^{-/-} submetidos à lesão traumática do nervo isquiático. Assim, foi possível observar que o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico foi abolido nos animais IL-4^{-/-}, quando comparado a animais selvagens, também exercitados. O efeito anti-hiperalgésico da IL-4 já foi demonstrado em modelos de dor inflamatória e neuropática, via ativação da STAT6 (CUNHA et al., 1999; HAO et al., 2006). Ademais, a IL-4 é de particular interesse, pois faz a ligação entre os sistemas imunológico e opioide, por induzir a transcrição dos receptores opioides μ e δ em cultura de células neuronais (BORNER et al., 2004; KRAUS et al., 2001) e de pró-opiomelanocortina (POMC) em linfócitos (BUSCH-DIENSTFERTIG et al., 2012). Reciprocamente, peptídeos opioides estão envolvidos no balanço Th1-Th2, em que a β -endorfina, liberada da POMC e receptores opioides pode ser considerada ativadora de Th2, e a

transcrição de IL-4 em células T pode ser estimulada por opioides endógenos e exógenos (BORNER et al., 2013).

Ao encontro de nossos resultados, Üçeyler e colaboradores (2011) caracterizaram o comportamento de dor e a responsividade a opioides no modelo de lesão por constrição crônica do nervo isquiático através da utilização de camundongos *knockout* para IL-4. Este trabalho demonstrou que os animais *knockout* para IL-4 desenvolveram hiperalgesia mecânica, além do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias e receptores opioides, o que se acredita ser devido a um mecanismo protetor frente ao aumento da dor após a lesão. Neste contexto, HAO et al. (2006) observaram que a transferência “*in vivo*” para camundongos, de genes que superexpressam IL-4, promoveu uma redução da hiperalgesia térmica e mecânica causada pela ligadura de nervo espinal. Ademais, foi demonstrado que o tratamento com a IL-4, através da administração perineural no local da lesão, após a ligadura parcial do nervo isquiático na fase de desenvolvimento da dor neuropática, foi capaz de suprimir o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica e da térmica (KIGUCHI et al., 2015). Os mesmos autores também demonstraram que a administração da IL-4 numa fase mais tardia, ou seja, após o desenvolvimento da dor, foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e térmica, e este efeito está relacionado à ativação do STAT6, pois a inibição desta via através do AS1517499 inibiu o efeito da IL-4 sobre a dor neuropática (KIGUCHI et al., 2015). Além disto, no presente estudo, foi observado aumento da hiperalgesia mecânica nos animais do grupo IL-4^{-/-} Sedentário, em relação ao grupo WT Sedentário, corroborando os dados destes pesquisadores, que destacaram o papel da IL-4 na redução da dor neuropática.

Por outro lado, é importante salientar que a IL-4 também possui efeitos biológicos adicionais à redução da dor neuropática, visto que foi relatado que a IL-4, juntamente com a IL-13, são citocinas-chave na mudança do fenótipo de macrófagos, de M1 para M2, via STAT6, sendo que ambas são expressas por macrófagos, basófilos, mastócitos e células T ativadas (ANTHONY et al., 2007). Os macrófagos que infiltram o local da lesão podem ter papéis distintos, do tipo pró-inflamatório ou anti-inflamatório, e a alteração fenotípica de macrófagos M1 para M2, estimulada pelo exercício físico através da IL-4, poderia atenuar a extensão da resposta inflamatória. De fato, foi demonstrado que o tratamento com IL-4 em cultura de células do nervo isquiático retiradas após a ligadura parcial reduziu o número de macrófagos com o fenótipo M1, o qual estava aumentado após a lesão, e aumentou as células com o fenótipo M2, além de aumentar a expressão da STAT6 fosforilada.

Também, o mesmo estudo demonstrou que o tratamento com IL-4 em cultura da linhagem de macrófagos J774A.1 promoveu uma redução da expressão do RNAm de moléculas específicas de macrófagos M1 (IL-1 β , quimiocina C-C motif ligante 3 [CCL3] e o cluster de diferenciação 86 [CD86]) e o aumento da expressão do RNAm de moléculas específicas de macrófagos M2 (Arg1, IL-10 e CD206) através ativação da via da STAT6 (KIGUCHI et al., 2015).

Até o presente momento, a fonte exata de IL-4 gerada durante a realização do exercício físico é desconhecida, contudo, é bem caracterizado o papel parácrino das citocinas derivadas das células Th2 em promover a diferenciação de monócitos circulantes em macrófagos M2 (MANTOVANI et al., 2004). Sobretudo, existe uma forte evidência de que a IL-4 pode promover a alteração do fenótipo de macrófagos para o subtipo M2_a e M2_c após a lesão do nervo, melhorando a infiltração de células de Schwann e promovendo rápido crescimento axonal no processo de regeneração (KIGUCHI et al., 2015; MOKARRAM et al., 2012). Ademais, tem sido demonstrado que o exercício físico pode modular a resposta imunológica e suprimir a reação inflamatória, por induzir a troca do fenótipo de macrófagos para o subtipo M2, em vários modelos animais (KAWANISHI et al., 2010; IKEDA et al., 2013).

Nesse contexto, através da avaliação do número total, bem como, do fenótipo de macrófagos na porção distal à lesão no nervo isquiático, pode-se estabelecer, pela primeira vez, que o efeito terapêutico do exercício físico ocorre por um mecanismo dependente da liberação da IL-4 e por consequente alteração fenotípica de macrófagos M1 para M2, na lesão do nervo isquiático (Figura 28). Hume e MacDonald (2012) demonstraram que macrófagos residentes no tecido podem se proliferar e se diferenciar através de mecanismos controlados por CSF1R (receptor 1 do fator estimulador de colônia) e seu ligante CSF-1 (fator estimulador de colônia-1) e IL-34, produzido pelo estroma do tecido local, para regular a densidade de células residentes. Além disso, foi demonstrado que a IL-4 pode induzir a proliferação de macrófagos residentes em concentrações homeostáticas, após infecção, independente do recrutamento de monócitos da corrente sanguínea (JENKINS et al., 2011).

No entanto, no presente estudo não foi observado redução do número de macrófagos totais nos animais IL-4^{-/-} em relação aos animais WT após a lesão. Isso pode ocorrer devido a diferença na gênese do processo inflamatório, ou seja, o mecanismo inflamatório gerado em função da lesão por esmagamento do nervo é diferente do originado por uma reação infecciosa (YDENS et al., 2012). O fenótipo de macrófagos

observado no nosso estudo demonstra um predomínio de macrófagos M1 nos animais WT Sedentários e a inversão fenotípica após o tratamento com o exercício físico, predominando o subtipo M2 nos animais WT Exercitados. No entanto, quando analisamos os animais IL-4^{-/-} Exercitados e WT Exercitados, observamos a perda desta capacidade de alteração fenotípica, predominando macrófagos do tipo M1 nos animais IL-4^{-/-} Exercitados. Este resultado vai ao encontro do aumento da concentração de IL-4 nos animais exercitados, demonstrando a importância desta interleucina em atenuar a dor neuropática e em promover a alteração fenotípica de macrófagos M1 para M2 (Figura 28).

Os macrófagos, como o fagócito primário do sistema imunológico inato, liberam neurotoxinas inflamatórias e citocinas, levando a degeneração e a necrose neural após a lesão (JULIUS; BASBAUM, 2001). Por outro lado, estas células removem *debris* celulares, estimulam fatores tróficos como o NGF e IL-6 (LINDHOLM et al., 1987; TOFARIS et al., 2002) e auxiliam no remodelamento da matriz extracelular. Esses efeitos opostos podem ser explicados pela existência de macrófagos fenotipicamente e funcionalmente heterogêneos. Nossos resultados sugerem que o aumento da concentração de IL-4 no local da lesão promovido pelo exercício físico poderia ser responsável por promover a alteração fenotípica gerando consequências funcionais que auxiliam no processo de reparo tecidual e regeneração após a lesão, como o aumento da migração e proliferação de células de Schwann, as quais guiam o processo regenerativo, como demonstrado anteriormente (MOKARRAM et al., 2012). No entanto, até o momento não se sabe se macrófagos fenotipicamente diferentes são seletivamente recrutados para o local da lesão ou se ocorre a mudança fenotípica após o recrutamento, pelas citocinas presentes localmente (SCHWARTZ et al., 2006).

Por outro lado, no presente estudo foram utilizados somente três marcadores da superfície de macrófagos (F4/80, CD11c e α CD206) para caracterizar o fenótipo celular após a lesão do nervo isquiático. Embora o marcador F4/80 seja bem caracterizado e talvez o melhor marcador da superfície de macrófagos maduros e monócitos sanguíneos (AUSTYN; GORDON, 1981), o α CD206 (receptor de manose C, tipo 1) é um marcador da superfície de macrófagos do tipo M2_a e M2_c, enquanto que o cluster de diferenciação 163 (CD163) é um marcador comum de todos os subtipos de M2 (DAVID; KRONER, 2011). É evidente que outras maneiras de caracterizar o fenótipo de macrófagos, incluindo a análise de proteínas como citocinas e quimiocinas, e da expressão gênica, poderiam ajudar a caracterizar melhor os subtipos específicos destas

células e a esclarecer as características de diferenciação funcionais. Para isto, estudos futuros poderiam examinar marcadores da ativação de macrófagos adicionais, para caracterizar mais extensivamente o papel que diferentes subtipos de macrófagos desempenham na regeneração do SNP. Deste modo, a consequência da alteração fenotípica para macrófagos do subtipo M2_{a/c}, que ocorre nos animais que realizaram exercício físico, é a criação de um ambiente endógeno anti-inflamatório favorável para o processo regenerativo, como demonstrado pelo aumento da IL-1ra e redução da IL-1β e TNF-α, no local da lesão (BOBINSKI et al., 2011b), e estas alterações estariam contribuindo para o efeito observado no presente estudo. Corroborando estes resultados, foi demonstrado que a IL-1ra, agindo com afinidade similar à IL-1α e IL-1β em receptores de IL-1, é capaz de inibir a atividade desta interleucina, suprimindo a inflamação e estimulando a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 (CHAMBERLAIN et al., 2013).

6.1.3 Efeito do exercício físico na liberação de neurotrofinas

6.1.3.1 No local da lesão no nervo

O desenvolvimento e a manutenção do sistema nervoso requer a atividade de fatores de crescimento, dentre eles, as neurotrofinas, as quais são peptídeos com papel fundamental nos processos de crescimento, diferenciação e sobrevivência das células do tecido nervoso e, após uma lesão ou doença, são responsáveis por promover a regeneração de neurônios no SNC e SNP (THOENEN, 1991). De fato, foi possível observar no presente estudo que o modelo de esmagamento do nervo induziu redução da concentração das neurotrofinas β-NGF e BDNF no local da lesão. Entretanto, outros trabalhos demonstraram que a expressão do RNAm do BDNF no nervo isquiático estava aumentada do 7º ao 28º dia após a lesão, num modelo de neurotmease, enquanto que, num modelo de axoniotmease, a expressão gênica do BDNF estava aumentada no 14º dia, mas retornava ao normal no 28º dia após a lesão (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; OMURA et al., 2005b). Ademais, foi demonstrado um aumento da regulação do BDNF e do receptor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}) nas células de Schwann durante o processo de degeneração Walleriana distal (ZHANG et al., 2000).

Por outro lado, a realização do exercício físico foi capaz de promover o restabelecimento das concentrações de β-NGF e BDNF no local da lesão (um sumário dos efeitos do exercício físico no nervo isquiático está representado na Figura 28). Assim, o aumento da

concentração destas neurotrofinas no nervo isquiático poderia explicar a estimulação da regeneração nervosa observada no grupo de animais exercitados, destacado pela análise histológica descritiva deste estudo. Além disso, em nosso estudo prévio, observou-se que o exercício físico promoveu o aumento do número de fibras mielinizadas, bem como a recuperação da função motora (BOBINSKI et al., 2011b). Outra evidência observada no presente estudo, a qual reforça a hipótese de que o exercício físico promove regeneração nervosa, foi o aumento da expressão da proteína PMP22 no nervo isquiático dos animais exercitados, sendo que, a expressão da proteína PMP22 estava reduzida nos animais sedentários após a lesão (Figura 28). O aumento desta proteína pode ocorrer resultante do incremento do número de fibras mielinizadas e também, em decorrência do aumento da mielinização de axônios no processo de regeneração.

Corroborando com os nossos achados, alguns trabalhos na literatura evidenciam que poucos dias de exercício físico são suficientes para aumentar a produção de BDNF no músculo e no GRD, e também de NGF, melhorando a sobrevivência e a regeneração de axônios em modelos de lesões no SNP ou SNC (GOMEZ-PINILLA et al., 2001; MOLTENI et al., 2004; CHAE; KIM, 2009; NEEPER et al., 1995). Estudos demonstram que neurotrofinas, tais como o NGF, o BDNF, a NT-3 e a NT-4, promovem a sobrevivência de neurônios motores *in vitro* e *in vivo*, após a transecção nervosa (OPPENHEIM et al., 1992; KOLIATSOS et al., 1993) e induzem a maturação e a potenciação do desenvolvimento de terminais de neurônios motores (WANG; XIE; LU, 1995; WANG; POO, 1997). Ademais, foi demonstrado que o BDNF é expresso em neurônios motores e em seus músculos alvo, e o aumento da sua expressão é regulada pela desnervação. Também foi demonstrado que o gene que codifica o p145trkB, que é um receptor envolvido na transdução dos sinais do BDNF, está presente em motoneurônios alfa, e o BDNF é transportado seletivamente para estes motoneurônios através do músculo esquelético, prevenindo a morte neuronal num modelo de transecção do núcleo facial de ratos (KOLIATSOS et al., 1993).

Por outro lado, foi observado que o BDNF pode atuar no p75^{NTR} e promover a mielinização *in vitro*, em culturas de neurônios do GRD e células de Schwann. Além disso, os mesmos autores confirmaram que a bainha de mielina de camundongos knockout para o p75^{NTR} é menos espessa comparada a de camundongos selvagens (COSGAYA; CHAN; SHOOTER, 2002). Os neurônios do GRD também podem sintetizar BDNF, o qual pode ser transportado e liberado ao longo do axônio (NG et al., 2007). Além disso, as células de Schwann no sítio da lesão

também liberam fatores neurotróficos como o NGF e o BDNF. Em paralelo, a concentração dos receptores de NGF, o TrKA, está aumentada nas células de Schwann que formam as bandas de Büngner após a lesão. O NGF, após se ligar nos seus receptores, nas células de Schwann, é transferido através de transporte retrógrado do cone de crescimento para o corpo celular, estimulando e guiando a direção do neurônio em regeneração. Além disso, sabe-se que macrófagos que estão no local da lesão estimulam a produção de NGF através da IL-1 β (LYKISSAS et al., 2007).

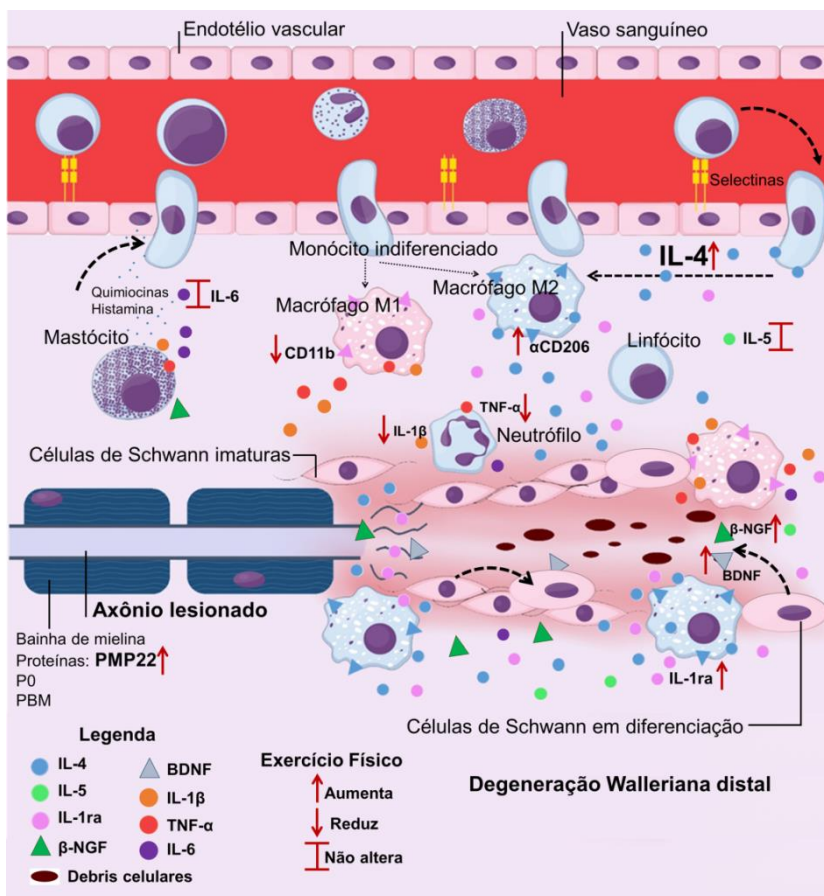
6.1.3.2 Na medula espinal

É notório que, apesar do envolvimento do BDNF e do NGF na regeneração axonal, essas neurotrofinas são conhecidas como mediadores e moduladores da dor e têm seus papéis amplamente definidos na gênese e na manutenção da dor neuropática (PEZET; MCMAHON, 2006; PEZET; MALCANGIO; MCMAHON, 2002). De fato, o NGF está aumentado no GRD e no corno dorsal da medula espinal após a axoniotmese, lesão por constrição crônica do nervo isquiático ou na neuropatia induzida por uma dieta rica em gordura (PATHAK et al., 2013; VAYNMAN; GOMEZ-PINILLA, 2005). Além disso, a administração de anticorpos anti-NGF reduziu a hiperalgisia mecânica após lesões em nervos espinais e lesão medular (FUKUOKA et al., 2001; GWAK et al., 2003; HERZBERG et al., 1997). Em conjunto, estes dados indicam que o NGF facilita a transmissão da dor no GRD e no corno dorsal da medula espinal.

No presente estudo, foi demonstrado que as concentrações de NGF e BDNF estavam aumentadas na medula espinal após a lesão do nervo isquiático, que se desenvolveu em paralelo à hiperalgisia mecânica em animais sedentários. Por outro lado, a realização de exercício físico de baixa intensidade por duas semanas reduziu as concentrações de BDNF e NGF na medula espinal. Considerando que neurônios e células gliais satélites ativadas são importantes fontes de NGF no GRD, e esta neurotrofina pode ser transportada pelos neurônios aferentes primários até o corno dorsal da medula espinal, tem sido sugerido que o aumento da expressão de genes relacionados à dor como o TRPV1, SP, CGRP, canais de sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 é mediado pelo NGF (LINDSAY; HARMAR, 1989; FANG et al., 2005). Além disso, o BDNF é bem conhecido por seu papel na modulação da dor, facilitando a resposta nociceptiva (LU et al., 2009; LU, COLMERS, SMITH, 2012). Na periferia, o BDNF é sintetizado no GRD e liberado por

neurônios aferentes primários e por células de Schwann, enquanto, no corno dorsal da medula espinal esta neurotrofina é liberada pelos terminais aferentes primários e também por células gliais ativadas.

Figura 28 - Efeito do exercício físico sobre as interações neuroimunes e liberação de neurotrofinas no local da lesão no nervo



Legenda: A figura representa a resposta imunológica e a liberação de neurotrofinas que ocorre após a lesão do nervo, no processo de degeneração Walleriana distal, bem como, o efeito do exercício físico sobre estes eventos. Células do sistema imunológico como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos são recrutadas para o local da lesão, se tornam ativadas e se espalham por todo o tronco distal do nervo lesionado.

Continuação da legenda da Figura 28.

Estas células liberam uma série de mediadores como, TNF- α , IL-1 β , β -NGF e IL-6 que potencializam o processo inflamatório. Os macrófagos recrutados para o local da lesão podem se diferenciar de acordo com o ambiente em: macrófagos M1 (pró-inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório). Por outro lado, o exercício físico induz um aumento da concentração de IL-4 e IL-1ra, além da redução de citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α , IL-1 β . A IL-4 promove um papel na polarização de macrófagos para a via anti-inflamatória M2 e a resposta de células Th2, com maior liberação de IL-4, juntamente com IL-1ra. O exercício físico promove o aumento do número de macrófagos M2, e a redução de macrófagos M1, o que poderia acelerar a remoção dos *debris* celulares, tornando o ambiente permissivo para o processo regenerativo. Além disso, o exercício físico aumenta as concentrações de neurotrofinas como, BDNF e β -NGF. Estas neurotrofinas podem ser liberadas por macrófagos e, principalmente, por células de Schwann, que após a lesão, iniciam a proliferação e diferenciação, e então formam as Bandas de Büngner, que servem como guias para os axônios em regeneração. Numa fase mais tardia, no processo de mielinização axonal, as células de Schwann promovem a síntese de proteínas que compõem a mielina, como a, proteína zero (P0), proteína básica da mielina (PBM) e proteína da mielina periférica 22 (PMP22), a qual também estava aumentada nos animais exercitados após a lesão no nervo isquiático.

Fonte: A autora (2015).

Ademais, o aumento do BDNF no GRD e na medula espinal, promovido pela lesão de nervos espinais, está relacionado ao aumento da excitabilidade de neurônios do corno dorsal que se projetam na via de transmissão da dor (FUKUOKA et al., 2001; OBATA et al., 2003). O BDNF potencializa a neurotransmissão excitatória glutamatérgica através da sua ligação com o receptor TrKB e da fosforilação das subunidades NR2A, NR2B e NR1 do receptor de glutamato NMDA (SLACK et al., 2004; DI LUCA et al. 2001) e, também modula a transmissão inibitória através de GABA/Glicina, além de regular a expressão de genes relacionados à dor, tais como c-fos, c-Jun, Krox-24 e CREB (LU et al., 2009; LU, COLMERS, SMITH, 2012; MERIGHI et al., 2008a, b).

Corroborando os resultados deste trabalho, um estudo demonstrou que o treinamento na esteira por cinco dias reduziu as concentrações de BDNF e NGF no GRD após a transecção e sutura do nervo isquiático de ratos (COBIANCHI et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que um programa de exercício aeróbio de natação, durante

cinco semanas, foi capaz de restaurar as concentrações de NGF e BDNF no GRD, promovendo paralelamente, a redução da hiperalgesia após a ligadura parcial do nervo isquiático de camundongos (ALMEIDA et al., 2015). Neste contexto, pode-se sugerir que a redução das concentrações de BDNF e NGF na medula espinal representa um dos mecanismos pelos quais o exercício físico previne a hiperalgesia mecânica após a lesão do nervo isquiático.

6.1.4 Efeito do exercício físico na liberação de citocinas anti-inflamatórias e ativação de células gliais

A ativação da microglia e dos astrócitos sensibiliza os neurônios no corno dorsal da medula por inúmeros mecanismos incluindo a liberação de moléculas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGs e BDNF (PARPURA et al., 1994; HOLGUIN et al., 2004; PEREA; ARAQUE, 2007; MILLIGAN; WATKINS, 2009). Ademais, tem sido sugerido que a microglia está envolvida no desenvolvimento da dor neuropática e o astrócito na sua manutenção (COLBURN; RICKMAN; DELEO, 1999; RAGHAVENDRA; TANGA; DELEO, 2003; 2004). No presente estudo, foi demonstrado que o exercício físico promoveu a criação de um ambiente endógeno anti-inflamatório na medula espinal, pelo fato de que, houve aumento das concentrações de IL-4, IL-5 e IL-1ra, que se encontravam reduzidas após a lesão, bem como redução as concentrações de BDNF e NGF, discutidas anteriormente. Foi observado também que não ocorreu alteração na concentração de IL-6 na medula espinal, nos animais sedentários e exercitados, no entanto, anteriormente havíamos demonstrado que o exercício físico reduziu a concentração do IL-6R na medula espinal (BOBINSKI et al., 2011b).

Além disso, o exercício físico foi capaz de reduzir a ativação da microglia e de astrócitos no corno dorsal da medula espinal, a qual estava aumentada após a lesão, nos animais não exercitados (um sumário dos efeitos do exercício físico na medula espinal está representado na Figura 29). Este resultado é consistente com a redução comportamental da dor neuropática. Ademais, a redução da imunomarcção de microglia e astrócitos nos animais exercitados foi observada, principalmente, nas lâminas superficiais (I-II) do lado ipsilateral e contralateral à lesão, mas também, observou-se uma redução da imunomarcção no lado ipsilateral à lesão nas lâminas mais profundas (III-VI). A atividade das células gliais nas lâminas superficiais (I-II) modula o processamento da dor, visto que as fibras

sensoriais A δ e C, que transmitem o estímulo nociceptivo, fazem sinapse nestas lâminas no corno dorsal. No entanto, como ocorre o brotamento de fibras A β , que normalmente fazem sinapse com neurônios de projeção localizados nas lâminas mais profundas (III-V), para as camadas mais superficiais nos estados de dor patológica, o efeito do exercício físico em promover a redução da ativação glial nestas camadas, também poderia contribuir para a supressão da dor neuropática (CAMPBELL et al., 1988).

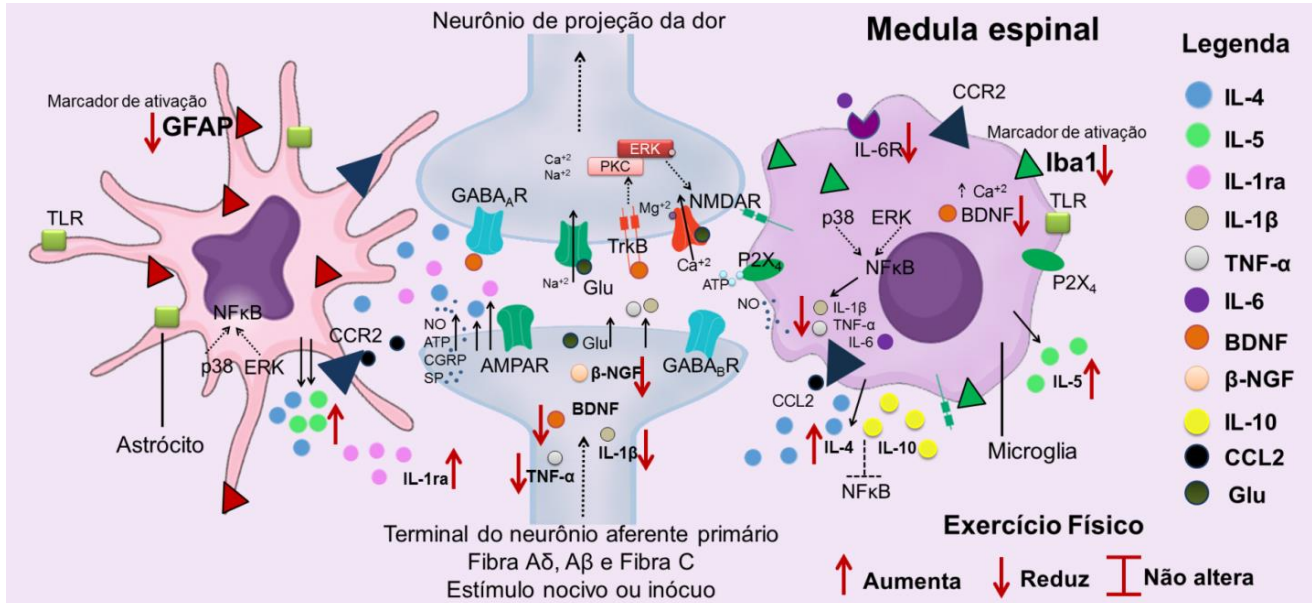
Existem poucos estudos demonstrando o efeito do exercício físico na reatividade das células gliais na medula espinal. Cobianchi et al. (2010) relataram que uma semana de exercício na esteira reduziu a reatividade de microglia e astrócitos no corno dorsal da medula espinal, após a lesão por constrição crônica do nervo isquiático em camundongos. Em um modelo genético de neuroinflamação, o treinamento crônico aeróbio reduziu a ativação de astrócitos e microglia e normalizou a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 e iNOS no encéfalo de camundongos treinados (LEEM et al., 2011).

Por outro lado, foi demonstrado que citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e a IL-10, poderiam ativar as células gliais de uma maneira que promove a sobrevivência neuronal e a inversão da dor neuropática em roedores (MILLIGAN et al.; 2006; GOSS; GOINS; GLORIOSO, 2007; MATA; HAO; FINK, 2008). Além disso, foi observado também que a IL-4 reduz a produção de mediadores inflamatórios como a iNOS, TNF- α , COX-2, IL-1 β e MCP-1 pela microglia ativada, além de induzir a morte da microglia ativada, *in vivo* e *in vitro* (FURLAN et al., 2000; LEDEBOER et al., 2000; YANG et al., 2002; PARK et al., 2005). Endogenamente, o RNAm e a proteína IL-4 foram encontrados em astrócitos e na microglia (HULSHOF et al., 2002; PARK et al., 2005). Desta maneira, podemos sugerir que o exercício físico estimula a liberação das citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e a IL-1ra dos terminais de neurônios periféricos no corno dorsal da medula espinal, através de macrófagos que infiltram o GRD após a lesão e também, estimula a liberação da IL-4 de astrócitos e da microglia, criando um ambiente endógeno anti-inflamatório, protetor para os neurônios.

Por outro lado, poucos papéis têm sido descritos para a IL-5 no SNC, porém ela é uma citocina secretada por células T e mastócitos e têm um papel conhecido na ativação e proliferação de eosinófilos e células B (TAKATSU et al., 1988). No entanto, a IL-5 foi identificada como uma citocina secretada por astrócitos e pela microglia *in vitro* e, ainda, foi descrito um papel mitogênico da IL-5 sobre a microglia e macrófagos, suportando a proliferação destas células (SAWADA et al.,

1993; RINGHEIM, 1995). Outro estudo demonstrou que a IL-5 induz a secreção de NGF de astrócitos em cultura (AWATSUJI et al., 1993), implicando um envolvimento direto em atividades neurotróficas no SNC. Portanto, como foi demonstrado no presente estudo o aumento das concentrações de IL-5 na medula espinal dos animais exercitados, podemos sugerir que esta interleucina estaria sendo liberada de astrócitos e microglia, estimulada pelo papel anti-inflamatório da IL-4 e da IL-1ra. A IL-1ra, por sua vez, poderia agir nos receptores de IL-1, promovendo supressão da resposta pró-inflamatória e estimulando a resposta anti-inflamatória no corno dorsal da medula espinal.

Figura 29 - Efeito do exercício físico na liberação de citocinas, neurotrofinas e ativação de células gliais na medula espinal.



Legenda: A figura representa as alterações induzidas pela lesão do nervo isquiático na medula espinal e os efeitos do exercício físico descritos neste trabalho, sobre estas alterações. Primeiramente a microglia e posteriormente os astrócitos, podem se ativar em resposta a mediadores pró-inflamatórios liberados pelo terminal do neurônio aferente primário, como, glutamato (Glu), NO, CGRP, SP e CCL2.

Continuação legenda da Figura 29.

Ademais, neurotrofinas como o BDNF e o β -NGF, e citocinas, como o TNF- α e a IL-1 β podem ser transportadas da periferia para o corno dorsal da medula espinal e contribuir para a ativação destas células gliais. Após a ativação, microglia e astrócitos promovem a síntese e liberação de mais mediadores pró-inflamatórios. Consequentemente, todos esses eventos gerados pela lesão do nervo contribuem para a sensibilização central e a manutenção da dor neuropática. No entanto, o exercício físico é capaz de reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α e IL-1 β e neurotrofinas como, BDNF e β -NGF, bem como, reduzir a concentração de receptores de IL-6 (IL-6R). Além disso, o exercício físico é capaz de estimular a resposta anti-inflamatória aumentando a concentração de mediadores como a IL-4, IL-5 e IL-1ra. Estes, por sua vez, poderiam ser os responsáveis pela redução da ativação de células gliais (microglia e astrócitos) no corno dorsal, concomitante à redução do comportamento de dor neuropática, observado nos animais exercitados após a lesão do nervo isquiático.

Fonte: A autora (2015).

6.2 PARTE II - PAPEL DAS MONOAMINAS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DO EXERCÍCIO FÍSICO APÓS A LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO

A segunda parte deste trabalho elucidou alguns dos efeitos do exercício físico no sistema de controle descendente da dor do tronco encefálico para a medula espinal, destacando o envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico. Nossos principais resultados foram que o exercício físico: i) produziu efeito anti-hiperalgésico que é prevenido pela depleção de 5-HT, mas não de catecolaminas; ii) aumentou as concentrações de 5-HT e 5-HIAA e reduziu o turnover de 5-HT no tronco encefálico; iii) reduziu a densidade dos SERT nos núcleos caudais da rafe bulbar e a expressão do RNAm dos SERT no tronco encefálico; iv) reduziu as concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) no tronco encefálico; v) aumentou a expressão do RNAm dos receptores de 5-HT (5-HT_{1A}R, 5-HT_{1B}R, 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2C}R e 5-HT_{3A}R) no tronco encefálico; e, por fim, vi) aumentou o *turnover* de NA e o seu conteúdo no tronco encefálico, e este é dependente da síntese de 5-HT.

6.2.1 Efeito proeminente do exercício físico na neurotransmissão serotoninérgica do tronco encefálico

Observando nossos resultados, propomos que a hiperalgesia mecânica crônica gerada após a lesão do nervo isquiático reflete, além da neuroinflamação periférica e central, uma redução da neurotransmissão serotoninérgica no tronco encefálico, com aumento dos SERT, redução da produção de 5-HT e alterações nos receptores serotoninérgicos. De fato, os dados do presente estudo sugerem que o exercício físico produz efeito anti-hiperalgésico através do aumento da neurotransmissão serotoninérgica no tronco encefálico. Este efeito envolve mecanismos analgésicos endógenos mediados pelas vias inibitórias de controle descendente da dor que se originam em sítios específicos do SNC, incluindo os núcleos da rafe, no tronco encefálico (um sumário dos efeitos do exercício físico no tronco encefálico destacado na Figura 30).

Evidências sustentam a ideia de que as manifestações comportamentais de dor crônica requerem a participação ativa de sítios supraespinhais, além de que estes sítios podem facilitar ou inibir a transmissão da dor (OSSIPOV, 2012). Foi demonstrado que, o aumento da resposta aos estímulos mecânico ou térmico ao frio, mas não ao estímulo térmico ao calor nocivo, em ratos com lesão no SNP ou inflamação da pata traseira é abolida pela transecção da medula espinal torácica, sustentando a hipótese da participação suprassgmentar no desenvolvimento da hiperalgesia (BIAN et al., 1998; SUN et al., 2001; SUNG et al., 1998).

Neste contexto, o RVM que consiste do núcleo RMg e na formação reticular ventral adjacente é um importante facilitador da dor, visto que a inativação desta região com anestésico local reduz a hiperalgesia mecânica em animais com lesão de nervo espinal (PERTOVAARA; WEI; HAMALAINEN, 1996). Os neurônios do RVM se projetam ao longo do funículo dorsolateral e terminam no corno dorsal da medula espinal, onde inibem a transmissão nociceptiva, através da liberação de mediadores endógenos como serotonina e opioides (SLUKA, 2009). Um estudo anterior sugere que o exercício físico produz analgesia por meio da ativação de vias inibitórias de controle da dor no SNC. Especificamente, em animais com lesão de nervos espinais o exercício físico regular aumentou a liberação de opioides na PAG e no RVM e, o bloqueio supraespinhal de opioides previniu a analgesia (STAGG et al., 2011). Além disso, o exercício físico reduziu a fosforilação de receptores NMDA no RVM, utilizado

como uma medida do aumento da facilitação da transmissão nociceptiva, visto que o aumento da neurotransmissão glutamatérgica está implicado no desenvolvimento e na manutenção da dor crônica (SLUKA et al., 2013).

Além disso, os núcleos caudais da rafe bulbar, como por exemplo, o ROb e o RPa, os quais modulam o *output* motor, também estão envolvidos nos efeitos mediados pelo exercício, evidenciado através do aumento da ativação destes núcleos, mensurada pela expressão de *c-fos*, em resposta ao exercício físico (SLUKA; RASMUSSEN, 2010). Além do seu papel no sistema motor, os neurônios caudais da rafe bulbar também expressam 5-HT e se projetam para as lâminas profundas do corno dorsal da medula espinal, respondendo aos *inputs* nocivos (MILLHORN et al., 1989; HOLSTEGE; KUYPERS, 1987). Assim, pode-se sugerir que os núcleos da rafe bulbar podem ser uma importante ligação entre o exercício físico e a dor neuropática através do sistema serotoninérgico.

No SNC, a eficiência da sinalização serotoninérgica é regulada pela liberação de 5-HT, pela atividade da enzima que sintetiza a 5-HT (Tph2), pelos autoreceptores modulatórios negativos 5-HT_{1A}R e 5-HT_{1B}R e pelo sistema de recaptação seletiva, o qual transporta a 5-HT liberada na fenda sináptica para dentro do neurônio serotoninérgico novamente, através do SERT (LAU; SCHLOSS, 2012). De fato, alguns estudos destacaram que a ativação dos núcleos serotoninérgicos do bulbo inibe a resposta induzida pelo estímulo nocivo (VEASEY et al., 1997; RAHMAN et al., 2006). Além disso, o exercício físico modifica a neurotransmissão serotoninérgica em diferentes regiões do SNC. Por exemplo, foi demonstrado que a atividade motora e o exercício físico induzem um aumento na concentração de 5-HT no corno dorsal e ventral da medula espinal de gatos (VEASEY et al., 1997), e também, induz um aumento na concentração de 5-HT na medula espinal, tronco encefálico, mesencéfalo, córtex cerebral e hipocampo de ratos (GERIN; BECQUET; PRIVAT, 1995; GOMEZ-MERINO et al., 2001; DEY; SINGH; DEY, 1992; BROWN et al., 1979), e melhora o metabolismo da 5-HT no córtex cerebral (DEY; SINGH; DEY, 1992).

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico em camundongos após a lesão do nervo isquiático foi reduzido pela depleção de 5-HT e que o exercício físico promove um aumento das concentrações de 5-HT e 5-HIAA no tronco encefálico. Outros estudos demonstraram que a analgesia produzida pela 5-HT na medula espinal pode ser estimulada pela atividade motora (JACOBS; MARTIN-CORA; FORNAL, 2002). Neste

contexto, pode-se sugerir que a analgesia induzida pela 5-HT nos animais exercitados poderia ser secundária ao aumento da atividade serotoninérgica nos núcleos da rafe bulbar devido à atividade motora. De modo interessante, apesar do conteúdo aumentado de 5-HT, a expressão do RNAm da enzima Tph2, a enzima limitante na biossíntese de 5-HT, foi alterada pela lesão do nervo isquiático ou pelo exercício físico após a lesão, o que sugere que o aumento da tradução da Tph2 não medeia o aumento do conteúdo de 5-HT no tronco encefálico. Alternativamente, alterações na atividade enzimática, na densidade e atividade do SERT ou mudanças nos autoreceptores 5-HT_{1A}R e 5-HT_{1B}R alteram diretamente o conteúdo de 5-HT (LAU; SCHLOSS, 2012).

De maneira interessante, foi observado que a lesão do nervo isquiático aumenta os SERT nos núcleos da rafe bulbar e este aumento é revertido pelo exercício físico. O SERT tem um papel chave na sinalização serotoninérgica, regulando a captação de 5-HT para dentro do neurônio pré-sináptico, desempenhando um papel crítico na duração e intensidade da atividade da 5-HT (LAU; SCHLOSS, 2012). Consequentemente, drogas que elevam a sinalização serotoninérgica são utilizadas na farmacoterapia da dor neuropática, como por exemplo, inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS), os quais se ligam ao SERT, bloqueiam a captação desta monoamina e, por consequência, aumentam a concentração extracelular da 5-HT (DWORKIN et al., 2007; MURAI et al., 2014). Neste contexto, a redução do RNAm e a densidade da proteína do SERT em camundongos exercitados são consistentes com os dados relatados do uso clínico de ISRS e poderiam reduzir a expressão dos SERT nos núcleos da rafe bulbar (LE POUL et al., 2000; LESCH et al., 1993; SWAN; NAJLERAHIM; BENNETT, 1997).

Um possível mecanismo que explica a redução da densidade dos SERT poderia ser a redução das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , no tronco encefálico de camundongos exercitados, as quais estavam aumentadas após a lesão do nervo isquiático nos animais sedentários. Nós demonstramos previamente que a lesão no nervo promove o aumento das concentrações de IL-1 β e TNF- α na medula espinal e no nervo isquiático e que o exercício físico de baixa intensidade reduz estas concentrações (BOBINSKI et al., 2011b). Corroborando os nossos resultados, foi demonstrado que a exposição em longo prazo a IL-1 β (RAMAMOORTHY et al., 1995) ou ao TNF- α (MOSSNER et al., 1998) aumenta a captação de 5-HT devido ao aumento na expressão e na função dos SERT em células JAR do

coriocarcinoma, o que é consistente com o aumento da densidade dos SERT nos núcleos da rafe bulbar em camundongos após a lesão do nervo, no presente estudo. Estudos anteriores demonstraram que, tanto o RNAm do TNF- α e da IL-1 β quanto a proteína, estão presentes nas vias que modulam a dor no tronco encefálico em populações neuronais específicas do SNC (CUNNINGHAM et al., 1992; IGNATOWSKI et al., 1997). Vale destacar que receptores para estas citocinas têm diferentes padrões de expressão no encéfalo (FARRAR et al., 1987; TAKAO et al., 1990; KINOUCI et al., 1991; CUNNINGHAM et al., 1992; MANFRIDI et al., 2003).

Está bem definido que a exposição de neurônios a citocinas pró-inflamatórias resulta em diversos efeitos neuronais prejudiciais ao SNC e leva a alterações comportamentais relacionadas a dor bastante evidentes (JULIUS; BASBAUM, 2001). Por exemplo, em preparações de fatias encefálicas de *guinea-pig*, a IL-1 β induz uma rápida redução da taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos da rafe dorsal (MANFRIDI et al., 2003). Também, o TNF- α aumenta tanto a atividade intrínseca quanto a densidade dos SERT na superfície celular, e pode aumentar o tráfico do SERT, através de mecanismos relacionados à proteína cinase (PK) C ou PKG (MOSSNER et al., 1998; QIAN et al., 1997; ZHU et al., 2004). Os nossos dados demonstraram claramente que o exercício físico diminuiu a expressão dos SERT nos núcleos da rafe bulbar, desta maneira, sugerimos que as concentrações reduzidas de TNF- α e IL-1 β no tronco encefálico de animais exercitados após a lesão no nervo poderiam reduzir os SERT pré-sinápticos, que, por sua vez, aumentaria a disponibilidade de 5-HT na sinapse.

Além disso, foi demonstrado anteriormente que o TNF- α também inibe a liberação de NA, por um mecanismo dependente da ativação do receptor α -2 adrenérgico (IGNATOWSKI et al., 1997). Considerando que o sistema catecolaminérgico também está envolvido na inibição central da nocicepção e interage com o sistema serotoninérgico (ARCHER et al., 1986; CUI et al., 1999), no presente estudo, verificou-se o papel das catecolaminas no efeito anti-hiperalgésico induzido pelo exercício físico após a lesão do nervo isquiático. Nossos resultados demonstraram que a inibição da síntese de catecolaminas com o AMPT não preveniu o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico. No entanto, embora as catecolaminas (DA e NA) não sejam necessárias para o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, observou-se um aumento no conteúdo de NA no tronco encefálico de animais exercitados. Neste sentido, sugere-se que a alta concentração de TNF- α em animais

sedentários com lesão do nervo isquiático poderia inibir a liberação de NA, o que por sua vez, poderia ser revertida pelo exercício físico.

Ademais, pode-se sugerir que interações entre o sistema serotoninérgico e noradrenérgico poderiam desempenhar um importante papel no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, visto que neste estudo foi demonstrado que o exercício físico aumentou o conteúdo de NA no tronco encefálico, e este, foi reduzido pela depleção de 5-HT com o PCPA. Este achado sugere que o conteúdo de NA aumentado no tronco encefálico dos animais exercitados depende da síntese de 5-HT. Corroborando com este resultado, observamos que a expressão gênica da enzima que converte DA em NA, a Dbh, não foi alterada com a lesão ou o exercício físico, sugerindo que, o que determina o aumento no conteúdo de NA nos animais exercitados é a sinalização serotoninérgica, visto que enzima responsável pela síntese de NA não estava aumentada nos animais exercitados.

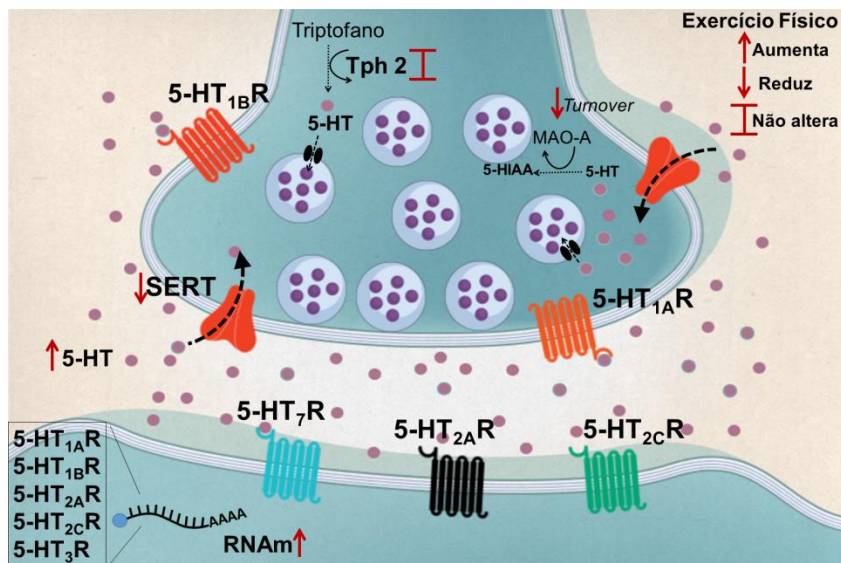
Numerosos estudos apontaram um importante papel inibitório para a neurotransmissão serotoninérgica que se projeta do RVM para o corno dorsal da medula espinal, no entanto, os subtipos de receptores de 5-HT associados à inibição da dor foram investigados principalmente a nível espinal (NAKAMURA et al., 2014; DOGRUL; OSSIPOV; PORRECA, 2009). Entretanto, fibras e terminais serotoninérgicos são encontrados por todo o RVM (STEINBUSCH, 1981), assim como subtipos de receptores de 5-HT, tais como 5-HT_{1A}R, 5-HT_{1C}R e 5-HT₂R (PAZOS; CORTES; PALACIOS, 1985; PAZOS; PALACIOS, 1985; THOR; BLITZ-SIEBERT; HELKE, 1990). No presente estudo foi possível observar que, após a lesão do nervo ocorreu um aumento na expressão do RNAm para os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{3A} no tronco encefálico, o que poderia ser um mecanismo compensatório na tentativa de melhorar a neurotransmissão serotoninérgica após a lesão. Visto que, o exercício físico melhora a neurotransmissão serotoninérgica no tronco encefálico, é aceitável que os receptores de 5-HT estejam envolvidos no efeito anti-hiperalgésico do exercício físico, contudo, ainda não são conhecidos quais os subtipos de receptores medeiam este efeito. Nossos resultados demonstraram que o exercício físico aumentou a expressão do RNAm dos receptores 5-HT_{1A}R, 5-HT_{1B}R, 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2C}R e 5-HT_{3A}R no tronco encefálico, e, embora o aumento da expressão gênica pode não refletir o aumento destas proteínas ou a função, nós hipotetizamos que o aumento da expressão de receptores de 5-HT é requerido para a sua ação no efeito anti-hiperalgésico produzido pelo exercício físico.

A relação entre síntese e degradação das monoaminas foi avaliada neste estudo através da taxa de *turnover* de 5-HT, NA e DA. Observou-se que, apesar da lesão do nervo não promover um aumento significativo da razão entre o metabólito 5-HIAA e a 5-HT (taxa de *turnover*), o exercício físico foi capaz de reduzir o *turnover* em relação aos animais sedentários. Este resultado sugere uma redução da oxidação da 5-HT pela enzima monoamina oxidase (MAO)-A nos neurônios serotoninérgicos do tronco encefálico, e desta forma, o aumento da disponibilidade da 5-HT na fenda sináptica, corroborando a ideia de que o exercício físico melhora a neurotransmissão serotoninérgica neuronal (TIPTON et al., 2004). Além disso, foi observado que a lesão não promoveu alterações na razão entre o metabólito DHPG e a NA, do mesmo modo, não foram alteradas as taxas de *turnover* noradrenérgico nos animais lesionados, submetidos ou não ao exercício físico, na medula espinal e no tronco encefálico. No entanto, o pré-tratamento com AMPT nos animais exercitados ou *per se*, além de reduzir a síntese de NA e, por sua vez, o seu conteúdo no tronco encefálico, também aumentou a taxa de *turnover*, o que implica no aumento da oxidação desta catecolamina nos neurônios noradrenérgicos do tronco encefálico (TIPTON et al., 2004).

Em relação a DA, está bem descrito a sua importância na modulação e ativação do sistema locomotor em nível segmentar e suprasegmentar (MILES; SILLAR, 2011). Sabe-se que o exercício físico pode modular as vias dopaminérgicas, e tem sido demonstrado que a diminuição do *turnover* da DA seria uma estratégia favorável para promover neuroproteção em modelos de doenças neurodegenerativas, nos quais a neurotransmissão dopaminérgica está prejudicada (GORTON et al., 2010; AGUIAR, 2011). Entretanto, apesar de não apresentar diferença significativa, os resultados apresentados neste estudo mostram que os animais submetidos à lesão do nervo isquiático apresentaram menores concentrações da DA no tronco encefálico e o tratamento com exercício físico induziu um ligeiro aumento destas concentrações, em relação aos animais sedentários. Por outro lado, o *turnover* pré-sináptico de DA demonstrado pelo aumento da razão entre o metabólito DOPAC e a DA, está aumentado na medula espinal dos animais exercitados, o que indicaria uma maior degradação da DA pela enzima MAO-B em células neuronais e não neuronais (TIPTON et al., 2004). Juntos, estes dados sugerem que o efeito anti-hiperalgésico do exercício físico de baixa intensidade no modelo de lesão por esmagamento do nervo isquiático não requer a participação do sistema dopaminérgico e sistema noradrenérgico. Contudo, estudos adicionais

são necessários para verificar a ação do exercício físico sobre a atividade ou conteúdo de enzimas responsáveis pela oxidação de monoaminas, como a MAO-A e MAO-B.

Figura 30 - Efeito do exercício físico de baixa intensidade sobre as sinapses serotoninérgicas do tronco encefálico



Legenda: A figura exemplifica os resultados deste estudo demonstrando o efeito do exercício físico sobre as sinapses serotoninérgicas do tronco encefálico, após a lesão por esmagamento do nervo isquiático, em camundongos. O exercício físico não altera a expressão da enzima triptofano hidroxilase 2 (Tph2), limitante da síntese de serotonina (5-HT), no entanto, o exercício físico aumenta o conteúdo de 5-HT no tronco encefálico. Além disso, o exercício físico reduz a densidade de marcação e a expressão gênica dos transportadores de serotonina (SERT) e aumenta a expressão gênica dos receptores de 5-HT (5-HT_{1A}R, 5-HT_{1B}R, 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2C}R e 5-HT_{3A}R). O efeito do exercício sobre a degradação da 5-HT é observado através da redução do *turnover* serotoninérgico, o que exemplifica uma redução da degradação da 5-HT em seu metabólito, o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). Todas essas alterações, estimuladas pelo exercício físico, contribuem para a melhora da neurotransmissão serotoninérgica e ocorrem simultaneamente à redução da dor neuropática.

Fonte: A autora (2015).

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a realização de exercício físico de baixa intensidade após a lesão do nervo isquiático promoveu a redução da dor neuropática, bem como acelerou a regeneração do nervo e a recuperação funcional, em camundongos. Perifericamente, os mecanismos envolvidos no efeito anti-hiperalgésico parecem depender da infiltração de células imunes, do aumento das concentrações locais da IL-4 e IL-1ra, e, por um mecanismo dependente da IL-4, o exercício físico promove a alteração fenotípica de macrófagos do subtipo M1 para o M2_{a/c}, gerando um ambiente endógeno anti-inflamatório favorável para o reparo e a regeneração axonal. Neste contexto, o exercício físico também ativou mecanismos que suportam a regeneração através do aumento da concentração das neurotrofinas BDNF e β -NGF, no nervo isquiático, que promovem a mielinização das fibras em processo de regeneração.

Centralmente, na medula espinal, o exercício físico promoveu aumento de mediadores anti-inflamatórios (IL-4, IL-5, IL-1ra) e redução de neurotrofinas (BDNF e β -NGF) que estão envolvidas no processo de sensibilização central; além de inibir a atividade de células gliais, através da redução da reatividade astrocitária e microglial no corno dorsal. Simultaneamente, no tronco encefálico, o exercício físico ativou vias de controle descendente da dor, que promovem analgesia após a lesão do nervo por aumentar, principalmente, a neurotransmissão serotoninérgica, através do aumento do conteúdo de 5-HT e 5-HIAA, e da expressão de receptores de 5-HT e redução da densidade dos SERT nos núcleos da rafe bulbar. A redução da densidade dos SERT parece ser mediada pela redução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no tronco encefálico dos animais exercitados.

Em síntese, os resultados aqui apresentados fornecem subsídios científicos para o emprego do exercício físico de baixa intensidade no tratamento da dor neuropática, recuperação da função motora e regeneração nervosa após lesões de nervos espinais, através de mecanismos que dependem da ativação do sistema neuroimunológico no local da lesão e na medula espinal, bem como a ativação do sistema endógeno descendente de controle da dor, em especial, da neurotransmissão serotoninérgica no tronco encefálico.

REFERÊNCIAS

- AAMODT, S. Focus on glia and disease. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1349, Nov 2007.
- ADERKA, D.; LE, J. M.; VILCEK, J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. **J Immunol**, v. 143, n. 11, p. 3517-23, Dec 1 1989.
- AGUIAR Jr, A. S. O exercício físico como agente modificador da doença de Parkinson e das discinesias induzidas por L-DOPA – evidências obtidas em modelos experimentais. 139p. Tese de doutorado - Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.
- AIMONE, L. D.; JONES, S. L.; GEBHART, G. F. Stimulation-produced descending inhibition from the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus in the rat: mediation by spinal monoamines but not opioids. **Pain**, v. 31, n. 1, p. 123-36, Oct 1987.
- ALHAIDER, A. A.; LEI, S. Z.; WILCOX, G. L. Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. **J Neurosci**, v. 11, n. 7, p. 1881-8, Jul 1991.
- ALHAIDER, A. A.; WILCOX, G. L. Differential roles of 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor subtypes in modulating spinal nociceptive transmission in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 265, n. 1, p. 378-85, Apr 1993.
- ALLEN, N. E. et al. The Rationale for Exercise in the Management of Pain in Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis**, Feb 3 2015.
- ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. **Prog Neurobiol**, v. 98, n. 1, p. 16-37, Jul 2012.
- ALMEIDA, C. et al. Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. **Pain**, v. 156, n. 3, p. 504-13, Mar 2015.
- ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 12, p. 975-87, Dec 2007.
- ARAKI, T.; NAGARAJAN, R.; MILBRANDT, J. Identification of genes induced in peripheral nerve after injury. Expression profiling and novel

gene discovery. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, n.36, p. 34131-34141. 2001.

ARAKI, T.; NAGARAJAN, R.; MILBRANDT, J. Identification of genes induced in peripheral nerve after injury. Expression profiling and novel gene discovery. **J Biol Chem**, v. 276, n. 36, p. 34131-41, Sep 7 2001.

ARCHER, T. et al. Noradrenergic-serotonergic interactions and nociception in the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 120, n. 3, p. 295-307, Jan 29 1986.

ARMADA-DA-SILVA, P. A. et al. Role of physical exercise for improving posttraumatic nerve regeneration. **Int Rev Neurobiol**, v. 109, p. 125-49, 2013.

ARRUDA, J. L. et al. Increase of interleukin-6 mRNA in the spinal cord following peripheral nerve injury in the rat: potential role of IL-6 in neuropathic pain. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 62, n. 2, p. 228-35, Nov 20 1998.

ASENSIO-PINILLA, E. et al. Electrical stimulation combined with exercise increase axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Exp Neurol**, v. 219, n. 1, p. 258-65, Sep 2009.

ASHTON, J. C.; GLASS, M. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. **Curr Neuropharmacol**, v. 5, n. 2, p. 73-80, 2007.

ASHWELL, K. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 58, n. 1, p. 1-12, Jan 15 1991.

AUSTYN, J. M.; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **Eur J Immunol**, v. 11, n. 10, p. 805-15, Oct 1981.

AWATSUJI, H. et al. Interleukin-4 and -5 as modulators of nerve growth factor synthesis/secretion in astrocytes. **J Neurosci Res**, v. 34, n. 5, p. 539-45, Apr 1 1993.

BACKONJA, M. M.; IRVING, G.; ARGOFF, C. Rational multidrug therapy in the treatment of neuropathic pain. **Curr Pain Headache Rep**, v. 10, n. 1, p. 34-8, Feb 2006.

BADKE, A.; IRINTCHEV, A. P.; WERNIG, A. Maturation of transmission in reinnervated mouse soleus muscle. **Muscle Nerve**, v. 12, n. 7, p. 580-6, Jul 1989.

- BARRETTE, B. et al. Requirement of myeloid cells for axon regeneration. **J Neurosci**, v. 28, n. 38, p. 9363-76, Sep 17 2008.
- BASBAUM, A. I. Descending control of pain transmission: possible serotonergic-enkephalinergic interactions. **Adv Exp Med Biol**, v. 133, p. 177-89, 1981.
- BEITZ, A. J. The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. **J Neurosci**, v. 2, n. 7, p. 829-42, Jul 1982.
- BENBOUZID, M. et al. Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. **Eur J Pain**, v. 12, n. 5, p. 591-9, Jul 2008.
- BENIGNI, F. et al. Ciliary neurotrophic factor inhibits brain and peripheral tumor necrosis factor production and, when coadministered with its soluble receptor, protects mice from lipopolysaccharide toxicity. **Mol Med**, v. 1, n. 5, p. 568-75, Jul 1995.
- BIAN, D. et al. Tactile allodynia, but not thermal hyperalgesia, of the hindlimbs is blocked by spinal transection in rats with nerve injury. **Neurosci Lett**, v. 241, n. 2-3, p. 79-82, Jan 30 1998.
- BIBANCOS, T. et al. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. **Genes Brain Behav**, v. 6, n. 6, p. 529-39, Aug 2007.
- BILLAT, V. L. et al. Inter- and intrastrain variation in mouse critical running speed. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 4, p. 1258-63, Apr 2005.
- BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337-48, Oct 27 2011b.
- BOBINSKI, F. Efeito neuroprotetor do exercício físico de baixa intensidade na lesão por esmagamento do nervo ciático em camundongos: estudos *in vivo* e *ex vivo*. 107p. Dissertação de mestrado - Pós-graduação em Neurociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011a.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 1, p. 64-76, Feb 2000.
- BOHATSCHEK, M. et al. In vitro model of microglial deramification: ramified microglia transform into amoeboid phagocytes following addition of brain cell membranes to microglia-astrocyte cocultures. **J Neurosci Res**, v. 64, n. 5, p. 508-22, Jun 1 2001.

BOLIN, L. M. et al. Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. **J Neurochem**, v. 64, n. 2, p. 850-8, Feb 1995.

BORNER, C. et al. mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes. **J Neuroimmunol**, v. 263, n. 1-2, p. 35-42, Oct 15 2013.

BORNER, C. et al. STAT6 transcription factor binding sites with mismatches within the canonical 5'-TTC...GAA-3' motif involved in regulation of delta- and mu-opioid receptors. **J Neurochem**, v. 91, n. 6, p. 1493-500, Dec 2004.

BORSOOK, D. A future without chronic pain: neuroscience and clinical research. **Cerebrum**, v. 2012, p. 7, May 2012.

BOUDRIAU, S. et al. Remodeling of the cytoskeletal lattice in denervated skeletal muscle. **Muscle Nerve**, v. 19, n. 11, p. 1383-90, Nov 1996.

BOUHASSIRA, D. et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380-7, Jun 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRIDGE, P. M. et al. Nerve crush injuries--a model for axonotmesis. **Exp Neurol**, v. 127, n. 2, p. 284-90, Jun 1994.

BROWN, B. S. et al. Chronic response of rat brain norepinephrine and serotonin levels to endurance training. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 46, n. 1, p. 19-23, Jan 1979.

BROWN, M. C.; LUNN, E. R.; PERRY, V. H. Consequences of slow Wallerian degeneration for regenerating motor and sensory axons. **J Neurobiol**, v. 23, n. 5, p. 521-36, Jul 1992.

BRUCK, W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. **Brain Pathol**, v. 7, n. 2, p. 741-52, Apr 1997.

BRUUN, J. M. et al. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 5, p. E961-7, May 2006.

BUSCH-DIENSTFERTIG, M. et al. JAK-STAT1/3-induced expression of signal sequence-encoding proopiomelanocortin mRNA in lymphocytes reduces inflammatory pain in rats. **Mol Pain**, v. 8, p. 83, 2012.

BUSHONG, E. A. et al. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. **J Neurosci**, v. 22, n. 1, p. 183-92, Jan 1 2002.

BYUN, Y. H. et al. Treadmill running promotes functional recovery and decreases brain-derived neurotrophic factor mRNA expression following sciatic crushed nerve injury in rats. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 45, n. 2, p. 222-8, Jun 2005.

CALEJESAN, A. A.; CH'ANG, M. H.; ZHUO, M. Spinal serotonergic receptors mediate facilitation of a nociceptive reflex by subcutaneous formalin injection into the hindpaw in rats. **Brain Res**, v. 798, n. 1-2, p. 46-54, Jul 6 1998.

CAMPBELL, J. N. et al. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 89-94, Jan 1988.

CAO, L.; DELEO, J. A. CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 2, p. 448-58, Feb 2008.

CAO, X.; SHOICHET, M. S. Investigating the synergistic effect of combined neurotrophic factor concentration gradients to guide axonal growth. **Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 381-9, 2003.

CASALE, T. B.; CAROLAN, E. J. Combination of IL-8 plus TNF alpha induces additive neutrophil migration. **Allergy Asthma Proc**, v. 20, n. 6, p. 361-3, Nov-Dec 1999a.

CASALE, T. B.; CAROLAN, E. J. Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium. **Inflamm Res**, v. 48, n. 1, p. 22-7, Jan 1999b.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**, v. 100, n. 2, p. 126-31, Mar-Apr 1985.

CHACUR, M. et al. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. **Pain**, v. 94, n. 3, p. 231-44, Dec 2001.

CHAE, C. H.; KIM, H. T. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. **Neurochem Int**, v. 55, n. 4, p. 208-13, Sep 2009.

CHAMBERLAIN, C. S. et al. Interleukin expression after injury and the effects of interleukin-1 receptor antagonist. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71631, 2013.

CHATZITHEODOROU, D. et al. A pilot study of the effects of high-intensity aerobic exercise versus passive interventions on pain, disability, psychological strain, and serum cortisol concentrations in people with chronic low back pain. **Phys Ther**, v. 87, n. 3, p. 304-12, Mar 2007.

CHYTROVA, G.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise normalizes levels of MAG and Nogo-A growth inhibitors after brain trauma. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 1, p. 1-11, Jan 2008.

CIDRAL-FILHO, F. J. Avaliação dos mecanismos fotobiológicos envolvidos na antinocicepção induzida pela terapia por diodo emissor de luz em Camundongos. 149p. Tese de doutorado - Pós-graduação em Neurociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

CLARK, A. K. et al. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. **Eur J Pain**, v. 11, n. 2, p. 223-30, Feb 2007.

COBIANCHI, S. et al. Differential effects of activity dependent treatments on axonal regeneration and neuropathic pain after peripheral nerve injury. **Exp Neurol**, v. 240, p. 157-67, Feb 2013.

COBIANCHI, S. et al. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v. 168, n. 1, p. 273-87, Jun 16 2010.

COLBURN, R. W.; RICKMAN, A. J.; DELEO, J. A. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. **Exp Neurol**, v. 157, n. 2, p. 289-304, Jun 1999.

COLLA, A. R. et al. Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 124, p. 108-16, Sep 2014.

COSGAYA, J. M.; CHAN, J. R.; SHOOTER, E. M. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. **Science**, v. 298, n. 5596, p. 1245-8, Nov 8 2002.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 1-32, 2009.

CUI, J. G. et al. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain**, v. 88, n. 3, p. 239-48, Dec 1 2000.

CUI, M. et al. Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 289, n. 2, p. 868-76, May 1999.

CUNHA, F. Q. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 1, p. 45-50, Jan 1999.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 3, p. 660-4, Nov 1992.

CUNNINGHAM, E. T., JR. et al. In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. **J Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 1101-14, Mar 1992.

DAFNY, N. et al. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. **Neuroscience**, v. 70, n. 2, p. 449-60, Jan 1996.

DAHLIN, L. B. Prevention of macrophage invasion impairs regeneration in nerve grafts. **Brain Res**, v. 679, n. 2, p. 274-80, May 15 1995.

D'ALMEIDA, J. A. et al. Behavioral changes of Wistar rats with experimentally-induced painful diabetic neuropathy. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 57, n. 3B, p. 746-52, Sep 1999.

DATAPREV. Regimento Interno do Instituto Nacional do Seguro Social - INSS. Disponível em: <<http://www010.dataprev.gov.br/sislex/paginas/66/MPS/2014/26.htm>>. Acesso em: dezembro de 2014.

DAVID, S.; KRONER, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 7, p. 388-99, Jul 2011.

DAVRANCHE, K.; MCMORRIS, T. Specific effects of acute moderate exercise on cognitive control. **Brain Cogn**, v. 69, n. 3, p. 565-70, Apr 2009.

DECOSTERD, I.; ALLCHORNE, A.; WOOLF, C. J. Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non-noxious mechanical stimulus-induced neuropathic pain. **Pain**, v. 100, n. 1-2, p. 155-62, Nov 2002.

DELEO, J. A. et al. Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. **J Interferon Cytokine Res**, v. 16, n. 9, p. 695-700, Sep 1996.

DESALLES, A. A. et al. Pain suppression induced by electrical stimulation of the pontine parabrachial region. Experimental study in cats. **J Neurosurg**, v. 62, n. 3, p. 397-407, Mar 1985.

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. 52, n. 6, p. 1095-9, Dec 1992.

DI LUCA, M. et al. NMDA receptor subunits are phosphorylated by activation of neurotrophin receptors in PSD of rat spinal cord. **Neuroreport**, v. 12, n. 6, p. 1301-5, May 8 2001.

DISHMAN, R. K. et al. Neurobiology of exercise. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 3, p. 345-56, Mar 2006.

DOBKIN, P. L.; BOOTHROYD, L. J. Organizing health services for patients with chronic pain: when there is a will there is a way. **Pain Med**, v. 9, n. 7, p. 881-9, Oct 2008.

DOGRUL, A.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. **Brain Res**, v. 1280, p. 52-9, Jul 14 2009.

DROSTE, C. et al. Effect of physical exercise on pain thresholds and plasma beta-endorphins in patients with silent and symptomatic myocardial ischaemia. **Eur Heart J**, v. 9 Suppl N, p. 25-33, Dec 1988.

DUBUISSON, D.; MELZACK, R. Analgesic brain stimulation in the cat: effect of intraventricular serotonin, norepinephrine, and dopamine. **Exp Neurol**, v. 57, n. 3, p. 1059-66, Dec 1977.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol**, v. 60, n. 11, p. 1524-34, Nov 2003.

DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132, n. 3, p. 237-51, Dec 5 2007.

- ELIAV, E. et al. Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. **Pain**, v. 83, n. 2, p. 169-82, Nov 1999.
- ELLINGSON, L. D. et al. Physical activity, sustained sedentary behavior, and pain modulation in women with fibromyalgia. **J Pain**, v. 13, n. 2, p. 195-206, Feb 2012.
- EWAN, E. E.; MARTIN, T. J. Analgesics as reinforcers with chronic pain: Evidence from operant studies. **Neurosci Lett**, v. 557 Pt A, p. 60-4, Dec 17 2013.
- EYSENCK, H. J. **Experiments in personality: Volume 1: Psychogenetics and psychopharmacology**. London: Routledge & Kegan Paul, 1960.
- FAJEMIROYE, J. O. et al. Antidepressive-Like Property of Dichloromethane Fraction of *Pimenta pseudocaryophyllus* and Relevance of Monoamine Metabolic Enzymes. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 659391, 2013.
- FANG, X. et al. *trkA* is expressed in nociceptive neurons and influences electrophysiological properties via Nav1.8 expression in rapidly conducting nociceptors. **J Neurosci**, v. 25, n. 19, p. 4868-78, May 11 2005.
- FARDIN, V.; OLIVERAS, J. L.; BESSON, J. M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia. **Brain Res**, v. 306, n. 1-2, p. 105-23, Jul 23 1984.
- FARMER, M. A. et al. Pain reduces sexual motivation in female but not male mice. **J Neurosci**, v. 34, n. 17, p. 5747-53, Apr 23 2014.
- FARRAR, W. L. et al. Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. **J Immunol**, v. 139, n. 2, p. 459-63, Jul 15 1987.
- FIELDS, R. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 6, p. 423-36, Jun 2006.
- FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. **Pain**, v. 150, n. 3, p. 573-81, Sep 2010.
- FREI, K. et al. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. **Eur J Immunol**, v. 19, n. 4, p. 689-94, Apr 1989.
- FUKUOKA, T. et al. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. **J Neurosci**, v. 21, n. 13, p. 4891-900, Jul 1 2001.

FUNAKOSHI, H. et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **J Cell Biol**, v. 123, n. 2, p. 455-65, Oct 1993.

FURLAN, R. et al. Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4. **J Neuroimmunol**, v. 111, n. 1-2, p. 86-92, Nov 1 2000.

GAO, Y. J.; JI, R. R. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 482-93, Oct 2010.

GARDINER, P. F.; MICHEL, R.; IADELUCA, G. Previous exercise training influences functional sprouting of rat hindlimb motoneurons in response to partial denervation. **Neurosci Lett**, v. 45, n. 2, p. 123-7, Mar 23 1984.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 110, 2011.

GENSEL, J. C. et al. Macrophages promote axon regeneration with concurrent neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 29, n. 12, p. 3956-68, Mar 25 2009.

GEORGE, A. et al. Wallerian degeneration after crush or chronic constriction injury of rodent sciatic nerve is associated with a depletion of endoneurial interleukin-10 protein. **Exp Neurol**, v. 188, n. 1, p. 187-91, Jul 2004.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor-alpha protein. **Neurosci Lett**, v. 372, n. 3, p. 215-9, Dec 6 2004.

GERIN, C.; BECQUET, D.; PRIVAT, A. Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity. I. A study with microdialysis probes implanted in the ventral funiculus of the spinal cord. **Brain Res**, v. 704, n. 2, p. 191-201, Dec 18 1995.

GHIANI, C. A. et al. Exercise decreases myelin-associated glycoprotein expression in the spinal cord and positively modulates neuronal growth. **Glia**, v. 55, n. 9, p. 966-75, Jul 2007.

GILLEN, C.; JANDER, S.; STOLL, G. Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system: comparison between immune-mediated demyelination and

Wallerian degeneration. **J Neurosci Res**, v. 51, n. 4, p. 489-96, Feb 15 1998.

GIRALDO, E. et al. Exercise intensity-dependent changes in the inflammatory response in sedentary women: role of neuroendocrine parameters in the neutrophil phagocytic process and the pro-/anti-inflammatory cytokine balance. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 4, p. 237-44, 2009.

GOLDSPINK, G.; YANG, S. Y. Effects of activity on growth factor expression. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 11 Suppl, p. S21-7, Dec 2001.

GOMEZ-MERINO, D. et al. Site-dependent effects of an acute intensive exercise on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in rat brain. **Neurosci Lett**, v. 301, n. 2, p. 143-6, Mar 30 2001.

GOMEZ-PINILLA, F. et al. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. **Eur J Neurosci**, v. 13, n. 6, p. 1078-84, Mar 2001.

GOMEZ-PINILLA, F. et al. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **J Neurophysiol**, v. 88, n. 5, p. 2187-95, Nov 2002.

GORDH, T.; CHU, H.; SHARMA, H. S. Spinal nerve lesion alters blood-spinal cord barrier function and activates astrocytes in the rat. **Pain**, v. 124, n. 1-2, p. 211-21, Sep 2006.

GORDON, S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 89-93, Jan 2007.

GORDON, T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. **J Commun Disord**, v. 43, n. 4, p. 265-73, Jul-Aug 2010.

GORTON, L. M. et al. Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. **Behav Brain Res**, v. 213, n. 2, p. 253-62, Dec 1 2010.

GOSS, J. R.; GOINS, W. F.; GLORIOSO, J. C. Gene therapy applications for the treatment of neuropathic pain. **Expert Rev Neurother**, v. 7, n. 5, p. 487-506, May 2007.

GRAY, B. G.; DOSTROVSKY, J. O. Red nucleus modulation of somatosensory responses of cat spinal cord dorsal horn neurons. **Brain Res**, v. 311, n. 1, p. 171-5, Oct 8 1984.

GRIFFIN, J. W.; GEORGE, R.; HO, T. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 52, n. 6, p. 553-60, Nov 1993.

GUIEU, R. et al. Nociceptive threshold and physical activity. **Can J Neurol Sci**, v. 19, n. 1, p. 69-71, Feb 1992.

GUO, W. et al. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. **J Neurosci**, v. 27, n. 22, p. 6006-18, May 30 2007.

GUTMANN, E.; JAKOUBEK, B. Effect of Increased Motor Activity on Regeneration of the Peripheral Nerve in Young Rats. **Physiol Bohemoslov**, v. 12, p. 463-8, 1963.

GWAK, Y. S. et al. Attenuation of mechanical hyperalgesia following spinal cord injury by administration of antibodies to nerve growth factor in the rat. **Neurosci Lett**, v. 336, n. 2, p. 117-20, Jan 16 2003.

HA, S. O. et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 107, n. 2, p. 301-9, 2001.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. **Endocr Rev**, v. 27, n. 7, p. 728-35, Dec 2006.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463-9, Jul 24 2008.

HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1387-94, Nov 2007.

HAO, S. et al. HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain. **Mol Pain**, v. 2, p. 6, 2006.

HASNIE, F. S. et al. Mechanical and cold hypersensitivity in nerve-injured C57BL/6J mice is not associated with fear-avoidance- and depression-related behaviour. **Br J Anaesth**, v. 98, n. 6, p. 816-22, Jun 2007.

HAYDEN, J. A.; VAN TULDER, M. W.; TOMLINSON, G. Systematic review: strategies for using exercise therapy to improve outcomes in chronic low back pain. **Ann Intern Med**, v. 142, n. 9, p. 776-85, May 3 2005.

HAYES, K. et al. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. **Acta Neuropathol**, v. 115, n. 3, p. 289-96, Mar 2008.

HEINRICH, P. C. et al. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. **Biochem J**, v. 334 (Pt 2), p. 297-314, Sep 1 1998.

HERBISON, G. J. et al. Effect of overwork during reinnervation of rat muscle. **Exp Neurol**, v. 41, n. 1, p. 1-14, Oct 1973.

HERBISON, G. J.; JAWEED, M. M.; DITUNNO, J. F. Effect of activity and inactivity on reinnervating rat skeletal muscle contractility. **Exp Neurol**, v. 70, n. 3, p. 498-506, Dec 1980a.

HERBISON, G. J.; JAWEED, M. M.; DITUNNO, J. F. Effect of swimming on reinnervation of rat skeletal muscle. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 37, n. 11, p. 1247-51, Nov 1974.

HERBISON, G. J.; JAWEED, M. M.; DITUNNO, J. F. Histochemical fiber type alterations secondary to exercise training of reinnervating adult rat muscle. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 61, n. 6, p. 255-7, Jun 1980b.

HERSHEY, G. K. et al. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. **N Engl J Med**, v. 337, n. 24, p. 1720-5, Dec 11 1997.

HERZBERG, U. et al. NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. **Neuroreport**, v. 8, n. 7, p. 1613-8, May 6 1997.

HIRATA, K.; KAWABUCHI, M. Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. **Microsc Res Tech**, v. 57, n. 6, p. 541-7, Jun 15 2002.

HOFFMAN, B. J.; MEZEY, E. Distribution of serotonin 5-HT_{1C} receptor mRNA in adult rat brain. **FEBS Lett**, v. 247, n. 2, p. 453-62, Apr 24 1989.

HOLGUIN, A. et al. HIV-1 gp120 stimulates proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation via activation of nitric oxide synthase-I (nNOS). **Pain**, v. 110, n. 3, p. 517-30, Aug 2004.

HOLSTEGE, J. C.; KUYPERS, H. G. Brainstem projections to spinal motoneurons: an update. **Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 809-21, Dec 1987.

HOLTZ, V.V.; STECHMAN NETO, J. Epidemiologia da dor em pacientes de Curitiba e região metropolitana. **Revista Dor**. v. 9, n.8, p.1217-24. 2008.

HULSHOF, S. et al. Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. **Glia**, v. 38, n. 1, p. 24-35, Apr 1 2002.

HUME, D. A.; MACDONALD, K. P. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. **Blood**, v. 119, n. 8, p. 1810-20, Feb 23 2012.

HUTCHINSON, K. J. et al. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. **Brain**, v. 127, n. Pt 6, p. 1403-14, Jun 2004.

IGNATOWSKI, T. A. et al. Neuronal-associated tumor necrosis factor (TNF alpha): its role in noradrenergic functioning and modification of its expression following antidepressant drug administration. **J Neuroimmunol**, v. 79, n. 1, p. 84-90, Oct 1997.

IKEDA, S. et al. Exercise-induced enhancement of insulin sensitivity is associated with accumulation of M2-polarized macrophages in mouse skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 441, n. 1, p. 36-41, Nov 8 2013.

INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia and neuropathic pain. **Glia**, v. 57, n. 14, p. 1469-79, Nov 1 2009.

INSTITUTE OF MEDICINE COMMITTEE ON ADVANCING PAIN RESEARCH AND EDUCATION. Education, and Research 2011. Disponível em: < <http://www.IMCAPRE.org> >. Acesso em: março de 2013.

IRINTCHEV, A.; CARMODY, J.; WERNIG, A. Effects on recovery of soleus and extensor digitorum longus muscles of prolonged wheel running during a period of repeated nerve damage. **Neuroscience**, v. 44, n. 2, p. 515-9, 1991.

IRINTCHEV, A.; DRAGUHN, A.; WERNIG, A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 231-43, 1990.

IRINTCHEV, A.; WERNIG, A. Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscle differences. **Cell Tissue Res**, v. 249, n. 3, p. 509-21, Sep 1987.

IRVING, G. A. Contemporary assessment and management of neuropathic pain. **Neurology**, v. 64, n. 12 Suppl 3, p. S21-7, Jun 28 2005.

JACOBS, B. L.; MARTIN-CORA, F. J.; FORNAL, C. A. Activity of medullary serotonergic neurons in freely moving animals. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 40, n. 1-3, p. 45-52, Oct 2002.

JAIN, K. K. Current challenges and future prospects in management of neuropathic pain. **Expert Rev Neurother**, v. 8, n. 11, p. 1743-56, Nov 2008.

JANAL, M. N. et al. On the absence of correlation between responses to noxious heat, cold, electrical and ischemic stimulation. **Pain**, v. 58, n. 3, p. 403-11, Sep 1994.

JENKINS, S. J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1284-8, Jun 10 2011.

JI, R.R.; WEN, Y.R. Neural–glial interaction in the spinal cord for the development and maintenance of nerve injury-induced neuropathic pain. **Drug Development Research**. v. 67, s.n., p. 331–338. 2006.

JOHNSON, M. H.; PETRIE, S. M. The effects of distraction on exercise and cold pressor tolerance for chronic low back pain sufferers. **Pain**, v. 69, n. 1-2, p. 43-8, Jan 1997.

JONES, S. L.; GEBHART, G. F. Spinal pathways mediating tonic, coeruleospinal, and raphe-spinal descending inhibition in the rat. **J Neurophysiol**, v. 58, n. 1, p. 138-59, Jul 1987.

JOURDAIN, P. et al. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 3, p. 331-9, Mar 2007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 13 2001.

KAWANISHI, N. et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exerc Immunol Rev**, v. 16, p. 105-18, 2010.

KAWASAKI, Y. et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. **Nat Med**, v. 14, n. 3, p. 331-6, Mar 2008.

KIGERL, K. A. et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. **J Neurosci**, v. 29, n. 43, p. 13435-44, Oct 28 2009.

KIGUCHI, N. et al. Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. **Pain**, Jan 27 2015.

KINOUCI, K. et al. Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor-alpha in the brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 181, n. 3, p. 1532-8, Dec 31 1991.

KLUDING, P. M. et al. The effect of exercise on neuropathic symptoms, nerve function, and cutaneous innervation in people with diabetic peripheral neuropathy. **J Diabetes Complications**, v. 26, n. 5, p. 424-9, Sep-Oct 2012.

KLUSAKOVA, I.; DUBOVY, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. **Ann Anat**, v. 191, n. 3, p. 248-59, Jun 2009.

KOHAMA, I.; ISHIKAWA, K.; KOCSIS, J. D. Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by Abeta afferents. **J Neurosci**, v. 20, n. 4, p. 1538-49, Feb 15 2000.

KOHUT, M. L.; BOEHM, G. W.; MOYNIHAN, J. A. Moderate exercise is associated with enhanced antigen-specific cytokine, but not IgM antibody production in aged mice. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 11, p. 1135-50, Aug 2001.

KOLIATSOS, V. E. et al. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. **Neuron**, v. 10, n. 3, p. 359-67, Mar 1993.

KOLTYN, K. F. et al. Perception of pain following aerobic exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 28, n. 11, p. 1418-21, Nov 1996.

KOLTYN, K. F. Analgesia following exercise: a review. **Sports Med**, v. 29, n. 2, p. 85-98, Feb 2000.

KOMORI, T. et al. Site-specific subtypes of macrophages recruited after peripheral nerve injury. **Neuroreport**, v. 22, n. 17, p. 911-7, Dec 7 2011.

KRAUS, J. et al. Regulation of mu-opioid receptor gene transcription by interleukin-4 and influence of an allelic variation within a STAT6 transcription factor binding site. **J Biol Chem**, v. 276, n. 47, p. 43901-8, Nov 23 2001.

KRELING, M.C.G.D.; CRUZ, D.A.L.M.; PIMENTA, C.A.M. Prevalência de dor crônica em adultos. **Revista Brasileira de enfermagem**. v. 59, n.4, p. 509-513. 2006.

KUHLMANN, T. et al. Macrophages are eliminated from the injured peripheral nerve via local apoptosis and circulation to regional lymph nodes and the spleen. **J Neurosci**, v. 21, n. 10, p. 3401-8, May 15 2001.

- KUPERS, R. C. et al. A time course analysis of the changes in spontaneous and evoked behaviour in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 50, n. 1, p. 101-11, Jul 1992.
- KUPHAL, K. E.; FIBUCH, E. E.; TAYLOR, B. K. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. **J Pain**, v. 8, n. 12, p. 989-97, Dec 2007.
- LANDMARK, T. et al. Associations between recreational exercise and chronic pain in the general population: evidence from the HUNT 3 study. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2241-7, Oct 2011.
- LANDMARK, T. et al. Estimating the prevalence of chronic pain: validation of recall against longitudinal reporting (the HUNT pain study). **Pain**, v. 153, n. 7, p. 1368-73, Jul 2012.
- LANDMARK, T. et al. Longitudinal associations between exercise and pain in the general population--the HUNT pain study. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65279, 2013.
- LAPORTE, A. M. et al. Quantitative autoradiographic mapping of 5-HT₃ receptors in the rat CNS using [125I]iodo-zacopride and [3H]zacopride as radioligands. **Synapse**, v. 10, n. 4, p. 271-81, Apr 1992.
- LAU, T.; SCHLOSS, P. Differential regulation of serotonin transporter cell surface expression. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling**, v. 1, n. 3, p. 259-268, 2012.
- LE POUL, E. et al. Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 1, p. 110-22, 2000.
- LEDEBOER, A. et al. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. **Glia**, v. 30, n. 2, p. 134-42, Apr 2000.
- LEE, M. C.; TRACEY, I. Unravelling the mystery of pain, suffering, and relief with brain imaging. **Curr Pain Headache Rep**, v. 14, n. 2, p. 124-31, Apr 2010.
- LEEM, Y. H. et al. Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 406, n. 3, p. 359-65, Mar 18 2011.
- LESCH, K. P. et al. Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 17, n. 1-2, p. 31-5, Jan 1993.

LESKOVAR, A. et al. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. **J Exp Biol**, v. 203, n. Pt 12, p. 1783-95, Jun 2000.

LEY, S.; WEIGERT, A.; BRUNE, B. Neuromediators in inflammation--a macrophage/nerve connection. **Immunobiology**, v. 215, n. 9-10, p. 674-84, Sep-Oct 2010.

LI, W.; ZHAO, Z. Q. Yohimbine reduces inhibition of lamina X neurones by stimulation of the locus coeruleus. **Neuroreport**, v. 4, n. 6, p. 751-3, Jun 1993.

LIEFNER, M. et al. The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. **J Neuroimmunol**, v. 108, n. 1-2, p. 147-52, Aug 1 2000.

LIGHT, A. R.; CASALE, E. J.; MENETREY, D. M. The effects of focal stimulation in nucleus raphe magnus and periaqueductal gray on intracellularly recorded neurons in spinal laminae I and II. **J Neurophysiol**, v. 56, n. 3, p. 555-71, Sep 1986.

LINDHOLM, D. et al. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 658-9, Dec 17-23 1987.

LINDSAY, R. M.; HARMAR, A. J. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. **Nature**, v. 337, n. 6205, p. 362-4, Jan 26 1989.

LIU, L. Y. et al. Comparison of blood-nerve barrier disruption and matrix metalloprotease-9 expression in injured central and peripheral nerves in mice. **Neurosci Lett**, v. 434, n. 2, p. 155-9, Mar 28 2008.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 31 2008.

LU, V. B. et al. Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 5, p. 1013-32, Mar 1 2009.

LU, V. B.; COLMERS, W. F.; SMITH, P. A. Long-term actions of BDNF on inhibitory synaptic transmission in identified neurons of the rat substantia gelatinosa. **J Neurophysiol**, v. 108, n. 2, p. 441-52, Jul 2012.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175-84, Jan 2007.

LUNN, E. R.; BROWN, M. C.; PERRY, V. H. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. **Neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 157-65, 1990.

LYKISSAS, M. G. et al. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. **Curr Neurovasc Res**, v. 4, n. 2, p. 143-51, May 2007.

MA, W.; EISENACH, J. C. Chronic constriction injury of sciatic nerve induces the up-regulation of descending inhibitory noradrenergic innervation to the lumbar dorsal horn of mice. **Brain Res**, v. 970, n. 1-2, p. 110-8, Apr 25 2003.

MACHELSKA, H. Control of neuropathic pain by immune cells and opioids. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 559-70, Aug 2011.

MACKINNON, S. E.; HUDSON, A. R.; HUNTER, D. A. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. **Plast Reconstr Surg**, v. 75, n. 3, p. 384-8, Mar 1985.

MAEDA, T. et al. Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 13076-81, Aug 4 2009.

MANFRIDI, A. et al. Interleukin-1beta enhances non-rapid eye movement sleep when microinjected into the dorsal raphe nucleus and inhibits serotonergic neurons in vitro. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 5, p. 1041-9, Sep 2003.

MANJAVACHI, M. N. et al. Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 345-55, Nov 2010.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004.

MANZANARES, J.; JULIAN, M.; CARRASCOSA, A. Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. **Curr Neuropharmacol**, v. 4, n. 3, p. 239-57, Jul 2006.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 521-32, Jul 2005.

MARQUESTE, T. et al. Chronic electrostimulation after nerve repair by self-anastomosis: effects on the size, the mechanical, histochemical and biochemical muscle properties. **Acta Neuropathol**, v. 111, n. 6, p. 589-600, Jun 2006.

MARQUESTE, T. et al. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. **J Appl Physiol** (1985), v. 96, n. 5, p. 1988-95, May 2004.

MARTIN, L. J.; TUTTLE, A. H.; MOGIL, J. S. The interaction between pain and social behavior in humans and rodents. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 20, p. 233-50, 2014.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. **Pain**, v. 152, n. 11, p. 2653-61, Nov 2011.

MARTINS, D. F. et al. High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. **Neuroscience**, v. 234, p. 69-76, Mar 27 2013.

MARTINS-SILVA, C. et al. Novel strains of mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter: insights on transcriptional regulation and control of locomotor behavior. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17611, 2011.

MATA, M.; HAO, S.; FINK, D. J. Gene therapy directed at the neuroimmune component of chronic pain with particular attention to the role of TNF alpha. **Neurosci Lett**, v. 437, n. 3, p. 209-13, Jun 6 2008.

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**, v. 11, n. 12, p. 1384-93, Dec 2010.

MCKOY, G. et al. Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation. **J Physiol**, v. 516 (Pt 2), p. 583-92, Apr 15 1999.

MCMAHON, S. B.; MALCANGIO, M. Current challenges in glia-pain biology. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 46-54, Oct 15 2009.

- MEDEIROS, C. et al. Exercise training reduces insulin resistance and upregulates the mTOR/p70S6k pathway in cardiac muscle of diet-induced obesity rats. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 3, p. 666-74, Mar 2011.
- MEEUSEN, R.; DE MEIRLEIR, K. Exercise and brain neurotransmission. **Sports Med**, v. 20, n. 3, p. 160-88, Sep 1995.
- MELZACK, R. Pain and the neuromatrix in the brain. **J Dent Educ**, v. 65, n. 12, p. 1378-82, Dec 2001.
- MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-9, Nov 19 1965.
- MENDELL, L. M. Computational functions of neurons and circuits signaling injury: relationship to pain behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108 Suppl 3, p. 15596-601, Sep 13 2011.
- MENDELL, L. M.; ALBERS, K. M.; DAVIS, B. M. Neurotrophins, nociceptors, and pain. **Microsc Res Tech**, v. 45, n. 4-5, p. 252-61, May 15-Jun 1 1999.
- MERIGHI, A. et al. BDNF as a pain modulator. **Prog Neurobiol**, v. 85, n. 3, p. 297-317, Jul 2008b.
- MERIGHI, A. et al. Presynaptic functional trkB receptors mediate the release of excitatory neurotransmitters from primary afferent terminals in lamina II (substantia gelatinosa) of postnatal rat spinal cord. **Dev Neurobiol**, v. 68, n. 4, p. 457-75, Mar 2008a.
- MILES, G. B.; SILLAR, K. T. Neuromodulation of vertebrate locomotor control networks. **Physiology (Bethesda)**, v. 26, n. 6, p. 393-411, Dec 2011.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355-474, Apr 2002.
- MILLHORN, D. E. et al. Individual cells in the raphe nuclei of the medulla oblongata in rat that contain immunoreactivities for both serotonin and enkephalin project to the spinal cord. **Exp Brain Res**, v. 75, n. 3, p. 536-42, 1989.
- MILLIGAN, E. D. et al. Intrathecal polymer-based interleukin-10 gene delivery for neuropathic pain. **Neuron Glia Biol**, v. 2, n. 4, p. 293-308, Nov 2006.
- MILLIGAN, E. D. et al. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. **Brain Res**, v. 861, n. 1, p. 105-16, Apr 7 2000.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 23-36, Jan 2009.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Res Rev**, v. 51, n. 2, p. 240-64, Aug 2006.

MOALEM, G.; XU, K.; YU, L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 3, p. 767-77, 2004.

MOKARRAM, N. et al. Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair. **Biomaterials**, v. 33, n. 34, p. 8793-801, Dec 2012.

MOLTENI, R. et al. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 22, p. 8473-8, Jun 1 2004.

MONACO, S. et al. MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. **J Neurocytol**, v. 21, n. 9, p. 623-34, Sep 1992.

MONK, K. R. et al. Mast cells can contribute to axon-glia dissociation and fibrosis in peripheral nerve. **Neuron Glia Biol**, v. 3, n. 3, p. 233-44, Aug 2007.

MOSSNER, R. et al. Enhancement of serotonin transporter function by tumor necrosis factor alpha but not by interleukin-6. **Neurochem Int**, v. 33, n. 3, p. 251-4, Sep 1998.

MOUSA, S. A. et al. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1331-41, Mar 2004.

MUELLER, M. et al. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. **Lab Invest**, v. 83, n. 2, p. 175-85, Feb 2003.

MURAI, N. et al. AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, exerts analgesic effects in a rat model of neuropathic pain with unique characteristics in spinal monoamine turnover. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 348, n. 3, p. 372-82, Mar 2014.

MURPHY, P. G. et al. Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. **J Neurosci**, v. 15, n. 7 Pt 2, p. 5130-8, Jul 1995.

MURPHY, P. G. et al. Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. **J Neurosci**, v. 19, n. 10, p. 3791-800, May 15 1999.

- NAIK, A. K.; PATHIRATHNA, S.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. GABAA receptor modulation in dorsal root ganglia in vivo affects chronic pain after nerve injury. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1539-53, Jul 17 2008.
- NAIR, A.; FREDERICK, T. J.; MILLER, S. D. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 17, p. 2702-20, Sep 2008.
- NAKAMURA, T. et al. The role of spinal serotonin receptor and alpha adrenoceptor on the antiallodynic effects induced by intrathecal milnacipran in chronic constriction injury rats. **Eur J Pharmacol**, v. 738, p. 57-65, Sep 5 2014.
- NARITA, M. et al. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 4, p. 739-50, Apr 2006a.
- NARITA, M. et al. Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical delta-opioid receptor dysfunction. **J Neurochem**, v. 97, n. 5, p. 1369-78, Jun 2006b.
- NAVRATILOVA, E. et al. Evaluation of reward from pain relief. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1282, p. 1-11, Apr 2013.
- NEEPER, S. A. et al. Exercise and brain neurotrophins. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 109, Jan 12 1995.
- NEUGEBAUER, V. et al. Forebrain pain mechanisms. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 226-42, Apr 2009.
- NEUGEBAUER, V. et al. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, v. 10, n. 3, p. 221-34, Jun 2004.
- NG, B. K. et al. Anterograde transport and secretion of brain-derived neurotrophic factor along sensory axons promote Schwann cell myelination. **J Neurosci**, v. 27, n. 28, p. 7597-603, Jul 11 2007.
- NIZARD, J. et al. Non-invasive stimulation therapies for the treatment of refractory pain. **Discov Med**, v. 14, n. 74, p. 21-31, Jul 2012.
- NORRBRINK, C. et al. Effects of an exercise programme on musculoskeletal and neuropathic pain after spinal cord injury--results from a seated double-poling ergometer study. **Spinal Cord**, v. 50, n. 6, p. 457-61, Jun 2012.
- NUSEIR, K.; PROUDFIT, H. K. Bidirectional modulation of nociception by GABA neurons in the dorsolateral pontine tegmentum that tonically

inhibit spinally projecting noradrenergic A7 neurons. **Neuroscience**, v. 96, n. 4, p. 773-83, 2000.

OBATA, K. et al. Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Pain**, v. 101, n. 1-2, p. 65-77, Jan 2003.

OHARA, P. T.; VIT, J. P.; JASMIN, L. Cortical modulation of pain. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 1, p. 44-52, Jan 2005.

O'LEARY, O. F. et al. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 192, n. 3, p. 357-71, Jun 2007.

OMURA, T. et al. Different expressions of BDNF, NT3, and NT4 in muscle and nerve after various types of peripheral nerve injuries. **J Peripher Nerv Syst**, v. 10, n. 3, p. 293-300, Sep 2005b.

OMURA, T. et al. Spatiotemporal quantification of recruit and resident macrophages after crush nerve injury utilizing immunohistochemistry. **Brain Res**, v. 1057, n. 1-2, p. 29-36, Sep 28 2005a.

OPPENHEIM, R. W. et al. Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. **Nature**, v. 360, n. 6406, p. 755-7, Dec 24-31 1992.

OSSIPOV, M. H. The perception and endogenous modulation of pain. **Scientifica (Cairo)**, v. 2012, p. 561761, 2012.

PARK, K. W. et al. Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 3, p. 397-402, Aug 1 2005.

PARPURA, V. et al. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 744-7, Jun 30 1994.

PATHAK, N. N. et al. Antihyperalgesic and anti-inflammatory effects of atorvastatin in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1468-78, Dec 2013.

PAZOS, A.; CORTES, R.; PALACIOS, J. M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. **Brain Res**, v. 346, n. 2, p. 231-49, Nov 4 1985.

PAZOS, A.; PALACIOS, J. M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. **Brain Res**, v. 346, n. 2, p. 205-30, Nov 4 1985.

- PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **J Pathol**, v. 204, n. 4, p. 428-37, Nov 2004.
- PEREA, G.; ARAQUE, A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1083-6, Aug 24 2007.
- PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 745-57, 2000.
- PERRY, V. H.; BROWN, M. C. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. **Bioessays**, v. 14, n. 6, p. 401-6, Jun 1992.
- PERTOVAARA, A.; WEI, H.; HAMALAINEN, M. M. Lidocaine in the rostroventromedial medulla and the periaqueductal gray attenuates allodynia in neuropathic rats. **Neurosci Lett**, v. 218, n. 2, p. 127-30, Nov 1 1996.
- PEZET, S.; MALCANGIO, M.; MCMAHON, S. B. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 40, n. 1-3, p. 240-9, Oct 2002.
- PEZET, S.; MCMAHON, S. B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 507-38, 2006.
- PINEAU, I.; LACROIX, S. Endogenous signals initiating inflammation in the injured nervous system. **Glia**, v. 57, n. 4, p. 351-61, Mar 2009.
- PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clin Exp Immunol**, v. 142, n. 3, p. 481-9, Dec 2005.
- PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 319-25, Jun 2002.
- PRATT, D.; FUCHS, P. N.; SLUKA, K. A. Assessment of avoidance behaviors in mouse models of muscle pain. **Neuroscience**, v. 248, p. 54-60, Sep 17 2013.
- QIAN, Y. et al. Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. **J Neurosci**, v. 17, n. 1, p. 45-57, Jan 1 1997.
- RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem Int**, v. 49, n. 4, p. 387-92, Sep 2006.
- RAFTERY, M. N. et al. Chronic pain in the Republic of Ireland--community prevalence, psychosocial profile and predictors of pain-related

disability: results from the Prevalence, Impact and Cost of Chronic Pain (PRIME) study, part 1. **Pain**, v. 152, n. 5, p. 1096-103, May 2011.

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. 20, n. 2, p. 467-73, Jul 2004.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F.; DELEO, J. A. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 306, n. 2, p. 624-30, Aug 2003.

RAHMAN, W. et al. Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation. **Pain**, v. 123, n. 3, p. 264-74, Aug 2006.

RAIMONDO, S., et al. Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part II - morphological techniques. **International Review of Neurobiology**. v.87, s.n., p. 81-103. 2009.

RAMAMOORTHY, S. et al. Regulation of the human serotonin transporter by interleukin-1 beta. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 216, n. 2, p. 560-7, Nov 13 1995.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, n. 3878, p. 444-5, Apr 25 1969.

RINGHEIM, G. E. Mitogenic effects of interleukin-5 on microglia. **Neurosci Lett**, v. 201, n. 2, p. 131-4, Dec 8 1995.

ROBB, K. A. et al. A pain management program for chronic cancer-treatment-related pain: a preliminary study. **J Pain**, v. 7, n. 2, p. 82-90, Feb 2006.

ROJAS VEGA, S. et al. Acute BDNF and cortisol response to low intensity exercise and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans. **Brain Res**, v. 1121, n. 1, p. 59-65, Nov 22 2006.

ROMERO-SANDOVAL, E. A.; HORVATH, R. J.; DELEO, J. A. Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 9, n. 7, p. 726-34, Jul 2008.

ROUMIER, A. et al. Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. **J Neurosci**, v. 24, n. 50, p. 11421-8, Dec 15 2004.

- RUTSCHMAN, R. et al. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. **J Immunol**, v. 166, n. 4, p. 2173-7, Feb 15 2001.
- SABATIER, M. J. et al. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. **Exp Neurol**, v. 211, n. 2, p. 489-93, Jun 2008.
- SAMA, M. A. et al. Interleukin-1beta-dependent signaling between astrocytes and neurons depends critically on astrocytic calcineurin/NFAT activity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 32, p. 21953-64, Aug 8 2008.
- SAWADA, M. et al. Production of interleukin-5 by mouse astrocytes and microglia in culture. **Neurosci Lett**, v. 155, n. 2, p. 175-8, Jun 11 1993.
- SCHAEFER, C. et al. Pain severity and the economic burden of neuropathic pain in the United States: BEAT Neuropathic Pain Observational Study. **Clinicoecon Outcomes Res**, v. 6, p. 483-96, 2014.
- SCHAFER, M. et al. Disruption of the gene for the myelin-associated glycoprotein improves axonal regrowth along myelin in C57BL/Wlds mice. **Neuron**, v. 16, n. 6, p. 1107-13, Jun 1996.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1361-8, Nov 2007.
- SCHUBERT, P. et al. Cascading glia reactions: a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling. **Ann N Y Acad Sci**, v. 903, p. 24-33, Apr 2000.
- SCHWARTZ, M. et al. Microglial phenotype: is the commitment reversible? **Trends Neurosci**, v. 29, n. 2, p. 68-74, Feb 2006.
- SEBURN, K. L.; GARDINER, P. F. Properties of sprouted rat motor units: effects of period of enlargement and activity level. **Muscle Nerve**, v. 19, n. 9, p. 1100-9, Sep 1996.
- SEO, T. B. et al. ERK1/2-mediated Schwann cell proliferation in the regenerating sciatic nerve by treadmill training. **J Neurotrauma**, v. 26, n. 10, p. 1733-44, Oct 2009.
- SHANKARAPPA, S. A.; PIEDRAS-RENTERIA, E. S.; STUBBS, E. B., JR. Forced-exercise delays neuropathic pain in experimental diabetes: effects on voltage-activated calcium channels. **J Neurochem**, v. 118, n. 2, p. 224-36, Jul 2011.
- SHARAN, P. et al. Mental health research priorities in low- and middle-income countries of Africa, Asia, Latin America and the Caribbean. **Br J Psychiatry**, v. 195, n. 4, p. 354-63, Oct 2009.

SIEVERS, J.; PARWARESCH, R.; WOTTGE, H. U. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. **Glia**, v. 12, n. 4, p. 245-58, Dec 1994.

SINISCALCO, D.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Molecular approaches for neuropathic pain treatment. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 16, p. 1783-7, 2007.

SKAPER, S. D.; POLLOCK, M.; FACCI, L. Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 97, n. 2, p. 177-85, Dec 30 2001.

SKUP, M. et al. Long-term locomotor training up-regulates TrkB(FL) receptor-like proteins, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. **Exp Neurol**, v. 176, n. 2, p. 289-307, Aug 2002.

SLACK, S. E. et al. Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 7, p. 1769-78, Oct 2004.

SLUKA, K. A. et al. Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. **J Appl Physiol (1985)**, v. 114, n. 6, p. 725-33, Mar 15 2013.

SLUKA, K. A. **Mechanisms and Management of Pain for the Physical Therapist**. Seattle: International Association for the Study of Pain/IASP Press, 2009. ISBN 9780931092770.

SLUKA, K. A.; RASMUSSEN, L. A. Fatiguing exercise enhances hyperalgesia to muscle inflammation. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 188-97, Feb 2010.

STAGG, N. J. et al. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. **Anesthesiology**, v. 114, n. 4, p. 940-8, Apr 2011.

STEIN, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. **N Engl J Med**, v. 332, n. 25, p. 1685-90, Jun 22 1995.

STEINBUSCH, H. W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. **Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 557-618, 1981.

STOLL, G. et al. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. **J Neurocytol**, v. 18, n. 5, p. 671-83, Oct 1989.

SUDAK, H. S.; MAAS, J. W. Behavioral-Neurochemical Correlation in Reactive and Nonreactive Strains of Rats. **Science**, v. 146, n. 3642, p. 418-20, Oct 16 1964a.

SUDAK, H. S.; MAAS, J. W. Central Nervous System Serotonin and Norepinephrine Localization in Emotional and Non-Emotional Strains in Mice. **Nature**, v. 203, p. 1254-6, Sep 19 1964b.

SUN, H. et al. Nerve injury-induced tactile allodynia is mediated via ascending spinal dorsal column projections. **Pain**, v. 90, n. 1-2, p. 105-11, Feb 1 2001.

SUNG, B. et al. Supraspinal involvement in the production of mechanical allodynia by spinal nerve injury in rats. **Neurosci Lett**, v. 246, n. 2, p. 117-9, Apr 24 1998.

SUTER, M. R. et al. Do glial cells control pain? **Neuron Glia Biol**, v. 3, n. 3, p. 255-68, Aug 2007.

SWAN, M. C.; NAJLERAHIM, A. R.; BENNETT, J. P. Expression of serotonin transporter mRNA in rat brain: presence in neuronal and non-neuronal cells and effect of paroxetine. **J Chem Neuroanat**, v. 13, n. 2, p. 71-6, Jul 1997.

TAKAHASHI, Y. et al. The macrophage-mediated effects of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuate tactile allodynia in the early phase of neuropathic pain development. **Anesth Analg**, v. 113, n. 2, p. 398-404, Aug 2011.

TAKAO, T. et al. Interleukin-1 receptors in mouse brain: characterization and neuronal localization. **Endocrinology**, v. 127, n. 6, p. 3070-8, Dec 1990.

TAKATSU, K. et al. T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties. **Immunol Rev**, v. 102, p. 107-35, Feb 1988.

TAM, S. L. et al. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. **J Neurosci**, v. 21, n. 2, p. 654-67, Jan 15 2001.

TAM, S. L.; GORDON, T. Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. **J Neurobiol**, v. 57, n. 2, p. 221-34, Nov 2003.

TANGA, F. Y.; RAGHAVENDRA, V.; DELEO, J. A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation

markers in a rat model of neuropathic pain. **Neurochem Int**, v. 45, n. 2-3, p. 397-407, Jul-Aug 2004.

TASKINEN, H. S.; ROYTТА, M. Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1alpha, RANTES) after peripheral nerve transection. **J Peripher Nerv Syst**, v. 5, n. 2, p. 75-81, Jun 2000.

TASKINEN, H. S.; ROYTТА, M. The dynamics of macrophage recruitment after nerve transection. **Acta Neuropathol**, v. 93, n. 3, p. 252-9, Mar 1997.

THACKER, M. A. et al. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. **Anesth Analg**, v. 105, n. 3, p. 838-47, Sep 2007.

THOENEN, H. The changing scene of neurotrophic factors. **Trends Neurosci**, v. 14, n. 5, p. 165-70, May 1991.

THOR, K. B.; BLITZ-SIEBERT, A.; HELKE, C. J. Discrete localization of high-density 5-HT1A binding sites in the midline raphe and parapyramidal region of the ventral medulla oblongata of the rat. **Neurosci Lett**, v. 108, n. 3, p. 249-54, Jan 22 1990.

TIPTON, K. F. et al. Monoamine oxidases: certainties and uncertainties. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 15, p. 1965-82, Aug 2004.

TOBLIN, R. L. et al. A population-based survey of chronic pain and its treatment with prescription drugs. **Pain**, v. 152, n. 6, p. 1249-55, Jun 2011.

TOFARIS, G. K. et al. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **J Neurosci**, v. 22, n. 15, p. 6696-703, Aug 1 2002.

TREMBLAY, M. E.; LOWERY, R. L.; MAJEWSKA, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. **PLoS Biol**, v. 8, n. 11, p. e1000527, 2010.

TRUINI, A.; GARCIA-LARREA, L.; CRUCCU, G. Reappraising neuropathic pain in humans--how symptoms help disclose mechanisms. **Nat Rev Neurol**, v. 9, n. 10, p. 572-82, Oct 2013.

TSURUOKA, M.; WILLIS, W. D. Descending modulation from the region of the locus coeruleus on nociceptive sensitivity in a rat model of inflammatory hyperalgesia. **Brain Res**, v. 743, n. 1-2, p. 86-92, Dec 16 1996.

UCEYLER, N. et al. IL-4 deficiency is associated with mechanical hypersensitivity in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28205, 2011.

UDINA, E. et al. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. **Ann Anat**, v. 193, n. 4, p. 347-53, Jul 2011.

UDINA, E. et al. FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers. **Exp Neurol**, v. 183, n. 1, p. 220-31, Sep 2003.

VALERO-CABRE, A. et al. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. **J Neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 95-108, Jan 2004.

VAN MEETEREN, N. L. et al. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 78, n. 1, p. 70-7, Jan 1997.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13427-31, Nov 9 1999.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 266-70, Mar 1999.

VANELDEREN, P. et al. The role of brain-derived neurotrophic factor in different animal models of neuropathic pain. **Eur J Pain**, v. 14, n. 5, p. 473 e1-9, May 2010.

VAYNMAN, S.; GOMEZ-PINILLA, F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 19, n. 4, p. 283-95, Dec 2005.

VEASEY, S. C. et al. Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to specific motor challenges in freely moving cats. **Neuroscience**, v. 79, n. 1, p. 161-9, Jul 1997.

WANG, T.; XIE, K.; LU, B. Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. **J Neurosci**, v. 15, n. 7 Pt 1, p. 4796-805, Jul 1995.

WANG, X. H.; POO, M. M. Potentiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4. **Neuron**, v. 19, n. 4, p. 825-35, Oct 1997.

WATKINS, E. A. et al. A population in pain: report from the Olmsted County health study. **Pain Med**, v. 9, n. 2, p. 166-74, Mar 2008.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol Rev**, v. 82, n. 4, p. 981-1011, Oct 2002.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 8, p. 450-5, Aug 2001.

WEI, F. et al. Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. **J Neurosci**, v. 28, n. 42, p. 10482-95, Oct 15 2008.

WERNIG, A.; SALVINI, T. F.; IRINTCHEV, A. Axonal sprouting and changes in fibre types after running-induced muscle damage. **J Neurocytol**, v. 20, n. 11, p. 903-13, Nov 1991.

WIECH, K.; PLONER, M.; TRACEY, I. Neurocognitive aspects of pain perception. **Trends Cogn Sci**, v. 12, n. 8, p. 306-13, Aug 2008.

WILLS-KARP, M.; FINKELMAN, F. D. Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. **Sci Signal**, v. 1, n. 51, p. pe55, 2008.

WONG, W. S.; FIELDING, R. Prevalence and characteristics of chronic pain in the general population of Hong Kong. **J Pain**, v. 12, n. 2, p. 236-45, Feb 2011.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, Jun 9 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. 2009. ISBN 978 92 4 156387 1.

WRIGHT, A.; SLUKA, K. A. Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain. **Clin J Pain**, v. 17, n. 1, p. 33-46, Mar 2001.

YAKEU, G. et al. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPARgamma and Th2 cytokines. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 2, p. 668-73, Oct 2010.

YANG, M. S. et al. Interleukin-13 and -4 induce death of activated microglia. **Glia**, v. 38, n. 4, p. 273-80, Jun 2002.

- YDENS, E. et al. Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 176, 2012.
- YIN, J. B. et al. Neurochemical properties of BDNF-containing neurons projecting to rostral ventromedial medulla in the ventrolateral periaqueductal gray. **Front Neural Circuits**, v. 8, p. 137, 2014.
- YING, Z. et al. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 193, n. 2, p. 411-9, Jun 2005.
- ZEILHOFER, H. U. Synaptic modulation in pain pathways. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 154, p. 73-100, 2005.
- ZHANG, J. Y. et al. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 12, p. 4171-80, Dec 2000.
- ZHU, C. B. et al. Adenosine receptor, protein kinase G, and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent up-regulation of serotonin transporters involves both transporter trafficking and activation. **Mol Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 1462-74, Jun 2004.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-10, Jun 1983.
- ZOCHODNE, D. W. **Neurobiology of Peripheral Nerve Regeneration**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. ISBN 9780511541759.
- ZUMWALT, J. W.; THUNSTROM, B. J.; SPANGELO, B. L. Interleukin-1beta and catecholamines synergistically stimulate interleukin-6 release from rat C6 glioma cells in vitro: a potential role for lysophosphatidylcholine. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 888-96, Feb 1999.
- ZUO, Y. et al. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. **Pain**, v. 105, n. 3, p. 467-79, Oct 2003.