

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

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, BIOQUÍMICA E
FARMACOLÓGICA E EFEITO DA NATAÇÃO SOBRE O
MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA DOR
COMPLEXA REGIONAL TIPO I EM CAMUNDONGOS**

Mestranda: TATIANE BRATTI

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisa Cristiana Winkelmann Duarte

Florianópolis
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Tatiane Bratti

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, BIOQUÍMICA E
FARMACOLÓGICA E EFEITO DA NATAÇÃO SOBRE O
MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA DOR
COMPLEXA REGIONAL TIPO I EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Concentração de Neuropsicobiologia.
Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Co-orientadora: Profa. Dra. Elisa Cristiana Winkelmann Duarte

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B824c Bratti, Tatiane

Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos [dissertação] / Tatiane Bratti ; orientador, Adair Roberto Soares Santos. - Florianópolis, SC, 2011.

107 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Camundongo como animal de laboratório. 3. Dor. 4. Isquemia. 5. Síndromes. 6. Inflamação. 7. Estresse Oxidativo. 8. Exercícios físicos. 9. Natação. I. Santos, Adair Roberto Soares dos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.


CDU 612.82

TATIANE BRATTI

**“CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL,
BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA E EFEITO DA
NATAÇÃO SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL DA
SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO I
EM CAMUNDONGOS”**

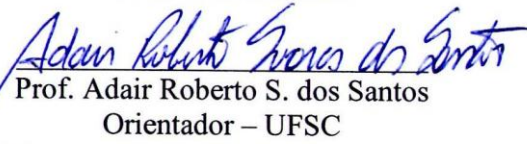
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2011.

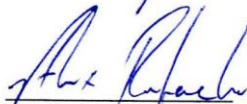


Profa. Carla Inês Tasca
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:




Prof. Adair Roberto S. dos Santos
Orientador – UFSC



Prof. Alex Rafacho
Membro - UFSC



Prof. Everson Araújo Nunes
Membro - UFSC



Profa. Déborah de C. Hizume
Membro da Banca Externo

Gostaria de dedicar este trabalho aos
meus maravilhosos pais:
Terezinha Gentil Menegatti Bratti e
Leonir Bratti

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, que torna tudo possível através do Seu amor que é infinito, e a **Nossa Senhora de Fátima**, por me acompanhar e interceder por mim.

Gostaria muito de agradecer aos **meus pais**, Terezinha G. M. Bratti e Leonir Bratti, por me educar, me apoiar e me amar de forma incondicional e me ensinar a ser quem eu sou. Ao **meu irmão** Diogo Bratti, por ser meu amigo, por saber dividir e à sua namorada Patricia por tornar nossa vida mais descontraída.

Agradeço com todo o meu coração ao **meu querido namorado** Diego, uma pessoa muito especial que se faz presente em minha vida mesmo através de um oceano e com sua alegria, companheirismo, amor e carinho, me ajuda a crescer e me tornar uma pessoa melhor. E agradeço a sua querida família: **dona Lourdinha, seu Altamir, Francis e Bruno**, por serem sempre tão carinhosos.

Agradeço muito às minhas amigas do coração **Grê, Mi, Thaisa, Cláudia, Nanda, Lê, Déia, Gi, Débs e Sara** que há anos alegam a minha vida e são capazes de me apoiar, entender quando preciso me afastar (como no final do mestrado) e principalmente me chamar para as coisas boas da vida de tempos em tempos.

Gostaria de expressar minha gratidão à professora Dra. **Elisa Cristiana Winkelmann Duarte**, minha co-orientadora, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, pela paciência e por me conduzir ao Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI).

Agradeço profundamente ao professor Dr. **Adair Roberto Soares dos Santos**, meu orientador, pela grande oportunidade de pesquisar dor e inflamação, pelos momentos de aprendizagem, pela equipe de trabalho e a estrutura oferecida que fizeram toda a diferença durante o meu mestrado.

A todo o pessoal do LANDI, obrigada por me ajudar a expandir os conhecimentos que obtive no mestrado: **Daniela**, a primeira pessoa dotada de paciência infinita para me receber no laboratório e ensinar o manuseio dos camundongos; **Fran**, minha dupla que tanto me ajudou em todas as etapas do mestrado, dividindo os aprendizados; **Leidi**, a segunda pessoa com paciência para ensinar técnicas laboratoriais desde as mais simples até as mais complicadas; **Daniel**, pelas idéias e pela co-orientação; **Fábio**, pelos neologismos, piadas, conversas e auxílios em farmacologia; **Deise**, pela paciência e pelos auxílios em farmacologia; **Marina e Débora**, pela alegria e por mostrar a visão

biológica das coisas nas aulas e seminários; **Chico**, pelas piadas e por aumentar minha biblioteca virtual e meus conhecimentos de design gráfico; **Morgs**, pelo bom humor, pelas dicas preciosas e cálculos de diluição; **Cris Baggio**, pelas aulas de dosagens de citocinas; **Cris Setim**, pelos bons exemplos; **Vanessa**, pelas aulas de laser e acupuntura; **Celeste**, pelo espanhol; **Ney**, **Serginho** e **Murilo**, pelos conhecimentos purinérgicos e farmacológicos; **Ari**, pela visão clínica e filosófica dos problemas; **Bira** e **Marci**, pelos conhecimentos em química.

Às pessoas de outros laboratórios que contribuíram para a minha formação: **Cibele** que veio de Porto Alegre me ensinar uma técnica; **André**, de Santa Maria com a técnica de medida dos tíois e **Tais** com aulas online; professor Dr. **Alcir Luiz Dafre e todos de seu laboratório** pela colaboração constante; professora Dra. **Alexandra Latini** e **Karina** pela paciência em inúmeros testes; **Chirle** por toda atenção que me prestou na utilização do microscópio do Fluorbeg.

A todos os **professores da Pós-graduação em Neurociências**, por compartilharem a sua sabedoria e ao Nivaldo, por sua prontidão e eficiência.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, em especial ao **seu Carlos** e **dona Vilma**, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos professores: Dra. **Deborah de Camargo Hizume**, Dr. **Everson Araújo Nunes** e Dr. **Alex Rafacho** por prontamente aceitarem revisar este trabalho e pelas ótimas contribuições.

Aos camundongos, por serem instrumentos do meu trabalho.

A **UFSC** pelo curso de mestrado e a **CAPES** pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho se realizasse:

Muito obrigada!

RESUMO

A síndrome da dor complexa regional (SDCR) pode ter início após um trauma, geralmente em uma extremidade, resultando em dor, disfunção da regulação vasomotora e sudomotora, mudanças tróficas na pele e anormalidades motoras. A SDCR pode ocorrer na ausência ou presença de lesão nervosa (tipo I ou II, respectivamente). Apesar de estudada, a SDCR ainda necessita de uma definição precisa que engloba o entendimento de sua patofisiologia. Diversos estudos demonstram que o exercício físico regular é capaz de beneficiar, neste contexto, positivamente a saúde diminuindo a dor ocasionada pela SDCR tipo I. Desta forma, os objetivos deste estudo foram: (1) caracterizar o modelo de SDCR tipo I em camundongos (Swiss) adultos machos através de análises bioquímicas, farmacológicas e comportamentais e (2) observar alguns efeitos do exercício físico de natação de alta intensidade neste modelo experimental. Para tanto, sob anestesia (hidrato de cloral – 7%, 0,6 mg/kg), os animais foram submetidos à isquemia prolongada através de um torniquete na pata traseira direita por um período de 3 horas que foi logo em seguida removido para permitir a reperfusão, induzindo a dor pós isquemia crônica (DPIC). O nervo tibial foi analisado através de microscopia óptica e foi detectada ausência de dano nervoso, demonstrando que o modelo trata da SDCR tipo I. Os animais submetidos à isquemia apresentaram inicialmente sinais de inflamação, com hiperemia e edema que duraram quatro a cinco dias, bem como hipersensibilidade ao frio (placa fria, 10 °C) por um período de quatro semanas, quando comparados aos animais naive. A hipersensibilidade mecânica (testada através de filamentos de von Frey) também foi evidente por quatro semanas e foi diminuída por anti-inflamatórios como ibuprofeno e dexametasona se tratada agudamente. Entretanto, em estágios crônicos, apenas os anti-neuropáticos (morfina ou gabapentina) e o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) foram capazes de reduzir a hipersensibilidade. No sexto dia após a lesão, a isquemia e reperfusão (IR) também aumentou os níveis de tióis, mas não os de citocinas na pele da pata e na medula dos camundongos. Na segunda fase do trabalho, foram observados os efeitos da natação sobre a DPIC, assim, comparou-se os grupos que realizaram o exercício de natação por 30 minutos durante cinco dias antes (NIR), após (IRN) ou antes e após a IR (NIRN). O exercício de natação aumentou a hiperemia e o grupo IRN apresentou diminuição do edema da pata. Além disso, todos os grupos que foram submetidos ao exercício apresentaram redução da hipersensibilidade mecânica. O grupo NIRN também apresentou

redução da hipersensibilidade térmica ao frio. Em conclusão, este estudo descreve primeiramente o perfil farmacológico, bioquímico e comportamental em camundongos com DPIC, modelo de SDCR tipo I; num segundo momento, mostra que o exercício de natação crônico de alta intensidade induz efeito anti-hipernociceptivo, sugerindo que este pode ser uma abordagem efetiva no tratamento da SDCR.

Palavras-chave: Dor pós isquemia crônica, dor neuropática, síndrome da dor complexa regional tipo I, inflamação, estresse oxidativo, exercício físico, natação.

ABSTRACT

Complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I) initiates after a trauma, usually in one of the limbs in which the patient develops pain, dysfunction of vasomotor regulation and sudomotor, trophical changes on skin and motor function abnormalities. CRPS-I does not cause nerve injury while complex regional pain syndrome-type II damages the nerves. Although studies on CRPS can be found in the literature, a formal and precise definition and also a better understanding of its pathophysiology is required. Additionally, many studies show that regular exercising can positively bring health benefits including reduction of pain caused by CRPS-I. Thus, the objectives of this study were: (1) characterization of an animal model of CRPS type-I (called chronic post-ischemic pain – CPIP in mice) using biochemical, pharmacological and behavioral analysis and (2) observation of the effects of high intensity swimming exercise on animal model. CPIP was induced following prolonged hind paw ischemia by placing a tourniquet proximal to the ankle joint for three hours in an anesthetized mouse and removing it to allow reperfusion. Light-microscopic examination of the tibial nerve taken from the region proximal to the tourniquet revealed no signs of nerve damage. Mice presented initial inflammation, hyperemia and edema that lasted four or five days, as well as cold hypersensitivity (cold plate, 10 °C) for a period of four weeks. Mechanical hypersensitivity (von Frey hairs) was also evident for four weeks and could be relieved by anti-inflammatory drugs like ibuprofen and dexamethasone if treated acutely. However, in chronic stages, only anti-neuropathic drugs (morphine or gabapentine) or antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) were able to reduce hypersensitivity. CPIP also increased thiols levels but did not affect the levels of pro-inflammatory cytokines in both hind paw skin and spinal cord in mice. Furthermore, swimming exercise changed the pattern of hyperemia and edema and reduced both mechanical and cold hypersensitivity in CRPS-I mice. In conclusion, this study describes the pharmacological, biochemical and behavioral analysis in a model CRPS-I applied in mice; and also indicates that the exercise of swimming has some benefits in CPIP, suggesting that it can be an effective approach to treat CRPS-I.

Keywords: Chronic post-ischemic pain, neuropathic pain, mice, complex regional pain syndrome-type I, inflammation, oxidative stress, exercise, swimming.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de funcionamento da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$	28
Figura 2 – Cascata tóxica na isquemia e na recirculação.	29
Figura 3 – Diagrama das fases contidas no algoritmo de tratamento da SDCR I.	34
Figura 4 – Esquema de padronização da lesão por IR da pata em camundongos.	44
Figura 5 – Anéis elásticos.....	45
Figura 6 – Paquímetro.....	47
Figura 7 – Termômetro utilizado para avaliar a temperatura local.	47
Figura 8 – Esquema dos tempos em que foram realizadas as medidas do edema e da temperatura.....	48
Figura 9 – Avaliação da hipersensibilidade mecânica com o filamento de von Frey.....	49
Figura 10 – Esquema dos tempos das análises da hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio.....	50
Figura 11 – Aparelho de placa quente e fria utilizado para avaliar a hipersensibilidade térmica ao frio (10°C).	51
Figura 12 – Esquema dos tempos em que foram realizadas as avaliações de hipersensibilidade mecânica após a administração dos analgésicos no segundo e no sétimo dia após IR.....	53
Figura 13 – Tempos das análises do limiar mecânico de retirada após a administração de NAC no segundo e sétimo dias após IR.....	54
Figura 14 – Representação da caixa plástica utilizada pelos camundongos para prática da natação.	55
Figura 15 – Esquema dos tempos do exercício e das análises comportamentais e bioquímicas do modelo de síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos.....	57
Figura 16 – Imagens representativas da pata de camundongos antes, durante e após a isquemia.....	59
Figura 17 – Imagens representativas da morfologia (painéis A e B) e densidade de axônios mielinizados (painel C) do nervo tibial de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	60
Figura 18 – Edema da pata induzido pela IR em camundongos.	62
Figura 19 – Hiperemia da pata induzida pela IR em camundongos.....	63
Figura 20 – Hipersensibilidade mecânica na pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	65
Figura 21 – Hipersensibilidade térmica ao frio (10°C) na pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).....	66
Figura 22 – Níveis de citocinas (interleucina- 1β , interleucina-6, interleucina-10 e fator de necrose tumoral- α) na pele da pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	67

Figura 23 – Níveis de citocinas (interleucina-1 β , interleucina-6, interleucina-10 e fator de necrose tumoral- α) na medula espinal de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	68
Figura 24 – Níveis de tióis na pele da pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	69
Figura 25 – Efeito do tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC) sobre a hipersensibilidade mecânica da pata em camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	71
Figura 26 – Efeitos do tratamento com ibuprofeno e dexametasona sobre a hipersensibilidade mecânica em camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	73
Figura 27 – Efeitos do tratamento com morfina e gabapentina sobre a hipersensibilidade mecânica da pata em camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	75
Figura 28 – Efeito da natação sobre o edema da pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	78
Figura 29 – Efeito da natação sobre a hiperemia da pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).	80
Figura 30 – Efeito da natação sobre a hipersensibilidade mecânica da pata de camundongos no primeiro dia após IR.	82
Figura 31 – Efeito da natação sobre a hipersensibilidade mecânica da pata de camundongos induzida por IR.	84
Figura 32 – Efeito da natação sobre a hipersensibilidade térmica ao frio (10°C) na pata de camundongos no primeiro dia após IR.	86
Figura 33 – Efeito da natação sobre a hipersensibilidade térmica ao frio (10°C) na pata de camundongos induzida por IR.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição aproximada de lesão prévia a síndrome da dor complexa regional	26
Tabela 2 – Tratamento farmacológico baseado em possíveis mecanismos da SDCR tipo I	35
Tabela 3 – Protocolo de natação	57
Tabela 4 – Níveis de tióis na medula espinal e na pele da pata de camundongos com DPIC após natação	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AINE – Anti inflamatório não esteroidal
ATC – Antidepressivo tricíclico
ATP – Adenosina tri fosfato
AVDs – Atividades de vida diária: conjunto de atividades realizadas cotidianamente por um indivíduo
Cat – Catalase
DPIC – Dor pós isquemia crônica
DSR – Distrofia simpático reflexa
E.P.M. – Erro padrão da média
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FO – Falso operado: animais que receberam anestesia sem ser submetidos a isquemia e reperfusão
GPx – Glutathione peroxidase
GSH – Glutathione
HbO₂ – Hemoglobina capilar
IASP – *International association for the study of pain* (associação internacional para o estudo da dor)
IL-1 – Interleucina-1
IL-10 – Interleucina-10
IL-1 β – Interleucina-1 β
IL-6 – Interleucina-6
IR – Isquemia e reperfusão da pata: animais que foram submetidos a isquemia e reperfusão da pata
IRD – Isquemia e reperfusão da pata + dexametasona: animais que foram submetidos a isquemia e reperfusão da pata e tratados com dexametasona
IRG – Isquemia e reperfusão da pata + gabapentina: animais que foram submetidos a isquemia e reperfusão da pata e tratados com gabapentina
IRI – Isquemia e reperfusão da pata + ibuprofeno: animais que foram submetidos a isquemia e reperfusão da pata e tratados com ibuprofeno
IRM – Isquemia e reperfusão da pata + morfina: animais que foram submetidos a isquemia e reperfusão da pata e tratados com morfina
IRN – Natação após a isquemia e reperfusão da pata: animais que foram submetidos ao protocolo de natação somente após a IR
IRNAC – Isquemia e reperfusão da pata + NAC: animais que foram submetidos a isquemia e reperfusão da pata e tratados com N-acetil-L-cisteína

IRRaso – Água rasa antes e após a isquemia e reperfusão da pata: animais que foram submetidos ao ambiente aquático sem realização de exercício antes e após a IR

ISRS – Inibidor seletivo da recaptção de serotonina

IRV – Isquemia e reperfusão da pata + veículo: animais que foram submetidos a isquemia e reperfusão da pata e tratados com veículo

MFEL – Máxima fase estável do lactato: a maior concentração de lactato sanguíneo na qual o equilíbrio entre sua formação e eliminação pode ser atingido durante o exercício prolongado com carga constante

N – Naive: animais que não foram submetidos a procedimentos prévios a avaliação

NA – Somente natação antes: exercício realizado ao mesmo tempo que o NIR sem lesão por IR na pata

NAC – N-acetil-L-cisteína

NAD – Somente natação antes e depois: exercício realizado ao mesmo tempo que o NIRN sem lesão por IR na pata

ND – Somente natação depois: exercício realizado ao mesmo tempo que o IRN sem lesão por IR na pata

NF κ B - Fator nuclear kappa B

NIR – Natação antes da isquemia e reperfusão da pata: animais que foram submetidos ao protocolo de natação somente antes da IR

NIRN –Natação antes e após a isquemia e reperfusão da pata: animais que foram submetidos ao protocolo de natação antes e após a IR

NPSH – Tiol não proteico

PSH – Tiol proteico

SDCR – Síndrome da dor complexa regional

SH – Tiol

SoD – Superóxido dismutase

TNF- α – *Tumoral necrose factor- α* (fator de necrose tumoral- α)

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento endotelial vascular)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL	25
1.2 ISQUEMIA.....	28
1.3 MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL	30
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL	31
1.5 INFLAMAÇÃO EM MODELO DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL	33
1.6 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO I	34
1.7 EXERCÍCIO FÍSICO (NATAÇÃO).....	36
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 ANIMAIS	43
4.2 INDUÇÃO DA LESÃO POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO (IR) NA PATA.....	44
4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	45
4.3.1 Preparação das amostras	45
4.3.2 Morfometria	46
4.3.3 Tratamento das imagens	46
4.4 MENSURAÇÃO DO EDEMA E TEMPERATURA DA PATA	47
4.5 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA.....	48
4.6 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO.....	50

4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	51
4.7.1 Determinação dos níveis de citocinas	51
4.7.2 Determinação dos níveis de tióis.....	52
4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ALGUNS ANALGÉSICOS	52
4.9 VERIFICAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RADICAIS LIVRES ...	54
4.10 NATAÇÃO.....	55
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5 RESULTADOS.....	59
5.1 HISTOLOGIA DO NERVO TIBIAL.....	60
5.2 EFEITOS DA IR NO EDEMA E NA HIPEREMIA DA PATA	61
5.3 EFEITOS DA IR SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA E TÉRMICA (AO FRIO) DA PATA.....	64
5.4 EFEITOS DA IR SOBRE OS NÍVEIS DE IL-1 β , IL-6, IL-10 E TNF- α NA MEDULA ESPINAL E NA PELE DA PATA DE CAMUNDONGOS.....	67
5.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TIÓIS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR.....	68
5.6 EFEITOS DO ANTIOXIDANTE (NAC) SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR.....	70
5.7 EFEITOS DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR.....	72
5.8 EFEITOS DE FÁRMACOS ANTI-NEUROPÁTICOS SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR.....	74
5.9 EFEITOS DA NATAÇÃO SOBRE O EDEMA E A HIPEREMIA DA PATA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR.....	76
5.10 EFEITOS DA NATAÇÃO SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR	81

5.11 EFEITOS DA NATAÇÃO SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR.....	85
5.12 EFEITOS DA NATAÇÃO SOBRE OS NÍVEIS DE TIÓIS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR.....	89
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL

A primeira descrição da síndrome da dor complexa regional (SDCR) foi feita pelo cirurgião Ambroise Pare, na França no século XVI, período em que o rei Charles IX relatava dor persistente e apresentava contraturas após certo procedimento de sangria. Em 1872, Mitchell utilizou o termo causalgia do grego *kausis*, que significa fogo, para descrever esta dor. Suas descrições continuam sendo as melhores a respeito do quadro clínico da SDCR, mas ao mesmo tempo marcam o início das controvérsias acerca desta síndrome. Por volta de 1900 na Alemanha, Sudeck descreveu uma síndrome dolorosa pós-traumática que incluía edema e modificações tróficas e, em 1939, Leriche desenvolveu a hipótese do ciclo vicioso que descreve a natureza circular da sintomatologia associada a SDCR. Somente em 1946, Evans introduziu o termo distrofia simpático reflexa (DSR) e, em 1994, a *International Association for the Study of Pain* (IASP) após uma reavaliação nomeou este quadro como sendo Síndrome da Dor Complexa Regional (FELIU; EDWARDS, 2010).

Para Stanton-Hicks e colaboradores (1998), ainda é necessário o entendimento da patofisiologia e mecanismo da doença para definir com precisão o que a constitui. Apesar disso, o termo SDCR foi estabelecido pelas seguintes razões:

- Dor: é considerada essencial para o diagnóstico da síndrome e inclui a dor espontânea ou evocada, como alodínia e hiperalgesia. Porém, em casos raros a dor pode ser mínima ou ausente;
- Complexa: expressa as características clínicas variadas encontradas nessas condições como dor, edema, atividade vasomotora com mudança de coloração do membro, hiperidrose, distonia, hipotrofia muscular e osteopenia;
- Regional: enfatiza que, na maioria dos casos, a síndrome envolve apenas uma região do corpo, geralmente uma extremidade. Entretanto, pode ocorrer noutra parte ou se espalhar para diferentes áreas do corpo.

Feliu e Edwards (2010) explicam que a taxonomia da SDCR inclui os seguintes critérios diagnósticos:

1. Presença de um evento nocivo iniciador;

2. Dor espontânea, que ocorre sem que seja necessário estímulo algum, podendo ser contínua;
3. Alodínia que é a dor provocada por estímulos que normalmente não causariam dor ou hiperalgesia em que a dor é desproporcional a qualquer lesão conhecida;
4. Presença ou história de evidência de edema, anormalidade do fluxo sanguíneo periférico ou atividade sudomotora anormal na região dolorosa desde o evento iniciador;
5. O diagnóstico é excluído pela existência de condições que possam contribuir para o grau da dor e disfunção.

Clinicamente, a SDCR pode ter início após um trauma, geralmente a uma extremidade. Este trauma pode ser uma fratura distal, lesão nervosa, lesão pós-cirúrgica, constrição do membro, síndromes de compressão nervosa, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, infecção, injeções e tumores (FELIU; EDWARDS, 2010).

A SDCR é relativamente rara, com uma incidência estimada de 26,20 por 100.000 pessoas (DE MOS et al., 2007). Baseados em dados epidemiológicos de uma população de Olmsted County em Minnesota nos Estados Unidos, Maihöfner, Seifert e Markovic (2010), mostraram uma taxa de incidência de 5,46/100.000/ano e uma taxa de prevalência de 20,57/100.000. A distribuição da SDCR entre as faixas etárias mostra um máximo entre a quinta e a sétima década de vida e uma proporção entre o sexo feminino e o masculino de 2-3:1. Estudos retrospectivos mostram uma prevalência de SDCR após fraturas entre 0,03% e 37% e a maioria dos pacientes tem algum tipo de trauma prévio, com uma distribuição aproximadamente como a demonstrada na tabela 1:

Tabela 1 – Distribuição aproximada de lesão prévia a síndrome da dor complexa regional

Causas	Distribuição (%)
Fraturas ou cirurgia	40%
Descompressão do nervo mediano	30%
Lesão radicular	9%
Lesão medular	6%
Pequenos traumas como torções	10%
Desenvolvimento espontâneo	5-10%

FONTE: Adaptado de Maihöfner, Seifert e Markovic (2010)

O mesmo estudo ainda afirma que não há correlação entre a severidade do trauma e a do desenvolvimento dos sintomas da SDCR.

A SDCR é dividida em dois tipos:

- Tipo I, chamado de distrofia simpático reflexa (DSR), trata de uma neuropatia que pode se desenvolver a partir de um trauma numa extremidade corpórea sem que ocorra lesão nervosa.
- Tipo II, também conhecido como causalgia, difere do tipo I justamente por apresentar lesão nervosa, mesmo que parcial, para confirmação diagnóstica (FELIU; EDWARDS, 2010).

Spielman e colaboradores (1981) relatam, além das causas supracitadas, a oclusão da artéria ulnar média simulando a SDCR tipo I.

Entre os sintomas da SDCR tipo I, encontram-se:

- Dor espontânea;
- Resposta dolorosa exacerbada a diversos estímulos (hiperalgesia);
- Dor evocada por estímulos inócuos (alodínia);
- Disfunção da regulação vasomotora e sudomotora;
- Mudanças tróficas na pele, cabelo, unhas e pele;
- Anormalidades motoras (VELDMAN et al., 1993).

Além disso, há estudos que relatam que estes sintomas seguem uma progressão temporal, resultando em três estágios definidos da síndrome:

1. Hiperemia e edema;
2. Frio, hiperidrose e cianose;
3. Distonia e modificações distróficas do segmento afetado.

Entretanto, há evidências de que nem todos os pacientes apresentam esta sequência temporal sendo que alguns podem apresentar ausência ou prolongamento de um ou mais estágios (CODERRE; BENNETT, 2010).

De acordo com Coderre e colaboradores (2004), o segmento corpóreo afetado pela SDCR tipo I apresenta diminuição da oxigenação pela hemoglobina capilar (HbO_2) e um aumento do lactato periféricos, refletindo aumento da glicólise anaeróbica. Os mesmos autores corroborando com Coderre e Bennett (2008) relatam que o tecido muscular do segmento amputado para alívio da dor causada pela SDCR tipo I apresenta pigmento lipofuscina, fibras hipotróficas e camadas da membrana basal dos capilares muito finas. Tais achados são consistentes com condições de isquemia com presença de estresse oxidativo resultando em microangiopatia em tecidos musculares.

1.2 ISQUEMIA

A isquemia é uma redução severa ou um completo bloqueio do fluxo sanguíneo. Já a hipóxia denota a redução no conteúdo de oxigênio no sangue, que ainda circula e pode remover metabólitos (ZEMKE et al., 2004).

Estudos experimentais identificaram quatro processos dominantes que, isolados ou combinados, levam ao dano neuronal após a isquemia, a saber: falta de energia (diminuição da adenosina trifosfato – ATP), aumento de cálcio intracelular, neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos e formação de radicais livres (TAYLOR; OBRENOVITCH; SYMON, 1996; FRANSEVA et al., 2001). Quando o ATP é depletado pela célula e os estoques de energia se esgotam, ocorre diminuição da função das bombas iônicas como a Na^+/K^+ -ATPase (figura 1), o mais importante transportador responsável pela manutenção das concentrações intracelulares altas de K^+ e Na^+ . A perda funcional desta bomba iônica resulta na redução dos gradientes iônicos transmembrana e consequentemente, o potencial transmembrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização (DUGAN; CHOI, 1994).

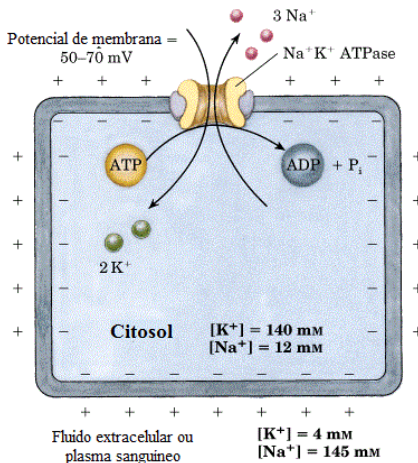


Figura 1 – Diagrama de funcionamento da Na^+/K^+ -ATPase.

Três íons Na^+ são transportados para fora da célula enquanto dois íons K^+ são transportados para dentro da célula com a desfosforilação de uma adenosina trifosfato (ATP) em uma adenosina difosfato (ADP). Este transportador é responsável por manter as concentrações intracelulares altas de K^+ e baixas de Na^+ , o que mantém o potencial de membrana. Quando falta ATP, perde-se o potencial de membrana e a célula despolariza.

Fonte: Lehninger, Nelson e Cox, 2000.

Nestas circunstâncias, os canais de cálcio dependentes de voltagem são ativados e estimulam a liberação dos estoques vesiculares de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular, particularmente o glutamato (DE KEYSER et al., 1999). Simultaneamente, os processos dependentes de energia – como a recaptação pré-sináptica de neurotransmissores – são bloqueados, aumentando ainda mais o acúmulo de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular. A ativação de receptores glutamatérgicos resulta no aumento de cálcio intracelular pela abertura direta de canais de cálcio (receptores ionotrópicos), pela ligação aos receptores acoplados a proteína G (receptores metabotrópicos) e por favorecer a saída do cálcio do retículo endoplasmático. Como resultado da ativação glutamatérgica, íons sódio e cloreto entram nos neurônios juntamente com água, levando ao edema celular (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). Desta forma, o aumento no cálcio intracelular inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares que causam danos teciduais através da ativação de enzimas proteolíticas, endonucleases, lipases e outras enzimas. Estas enzimas danificam diversas partes das células, culminando em morte (MITANI et al., 1993). Combinado com a liberação excessiva de glutamato, o aumento de cálcio é crucial na morte celular por lesão isquêmica. Estes dois fatores combinados a falta de ATP culminam no quadro da figura 2, com a demonstração do panorama geral do que ocorre durante a isquemia e na recirculação sanguínea.

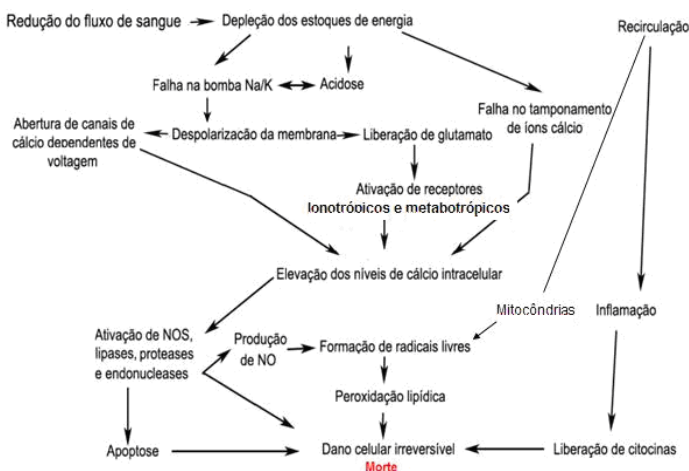


Figura 2 – Cascata tóxica na isquemia e na recirculação. Fonte: Adaptada de De Keyser et al., (1999).

A isquemia e a reperfusão favorecem a formação de radicais livres (SCHALLER; GRAF, 2004). Com o término da isquemia, as mitocôndrias estão debilitadas em função da abstinência de oxigênio. Quando ocorre a reperfusão, a disponibilidade de oxigênio aumenta, bem como as reações que geram radicais livres. A mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres após a lesão (FRANTSEVA; CARLEN; VELAZQUEZ, 2001), pois o oxigênio que volta a circular pode não ser totalmente utilizado pela fosforilação oxidativa, gerando radicais livres extremamente danosos para o tecido (PHILLIS et al., 1996). Outro componente do dano celular é a inflamação, que causa liberação de citocinas, contribuindo para a severidade da lesão (ASCHNER, 1998).

1.3 MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL

As buscas por estratégias que promovam a atenuação de diversas doenças têm sido motivos de muitos estudos dentro da Neurociência. Neste contexto, muitos modelos experimentais tanto *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* quanto *in silico* têm sido usados para proporcionar maior conhecimento sobre várias doenças que são acometidas de dor, em especial a dor crônica, visando o desenvolvimento de terapias que promovam, não só a redução da dor, mas uma adequada analgesia.

Coderre e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo da SDCR tipo I em ratos, e chamaram-no de dor pós isquemia crônica (DPIC). O método é simples e consiste na colocação de um torniquete no tornozelo do animal. Para isto o rato é anestesiado e um anel de borracha é colocado proximal a articulação do tornozelo, reduzindo o seu fluxo sanguíneo por três horas. Posteriormente o mesmo é removido para permitir a reperfusão. Dois dias após a reperfusão, o animal apresenta dor inflamatória e, no sétimo dia, dor neuropática. A partir deste modelo, informações adicionais sobre a SDCR, como mecanismos e diferentes abordagens terapêuticas puderam ser melhor compreendidas.

O uso de camundongos em estudos pré-clínicos é muito comum, pois este animal possui processos biológicos bastante semelhantes aos seres humanos. Além disso, o uso de camundongos torna possível a manipulação genética e, neste sentido, destaca-se a importância de padronizar o modelo de SDCR tipo I em camundongos (BAPTISTA et al., 2007).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL

Na mitocôndria, o oxigênio é utilizado na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons, sendo fundamental para os organismos aeróbios. Entretanto, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas em nível intracelular e extracelular, criando então o chamado “paradoxo do oxigênio”. Essas substâncias tóxicas são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO); algumas delas são radicais livres, outras são agentes oxidantes não radicalares (como o peróxido de hidrogênio). O termo radical livre é designado para qualquer espécie capaz de existência independente (por isso o termo livre), que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Para lidar com este paradoxo, a célula possui uma série de mecanismos capazes de evitar o efeito deletério destas ERO geradas pelo metabolismo aeróbio, organizadas em diferentes níveis. Estes mecanismos são comumente chamados de defesas antioxidantes, e incluem diferentes níveis de proteção, que podem ser resumidos em três formas principais de atuação: evitar a formação de ERO, neutralizar estas espécies reativas e reparar danos ocasionados por elas. Assim, o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo. Entretanto, mesmo em nível fisiológico, não há total prevenção na formação e/ou atuação das ERO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Alguns trabalhos demonstraram também que as ERO podem adquirir importantes funções como a sinalização celular que utiliza processos oxidativos como sinalizadores. Além disso, é possível citar outros mecanismos como: controle da ventilação respiratória, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular, aderência de leucócitos a células endoteliais ou até mesmo a ativação da resposta imunológica específica contra patógenos no processo inflamatório (DRÖGE, 2002). Por outro lado, o ataque de ERO a biomoléculas pode causar disfunções celulares que podem ser divididos em três categorias principais: lipoperoxidação, oxidação de proteínas e oxidação do DNA.

Para minimizar estas disfunções, existem as defesas antioxidantes que podem ser enzimáticas ou não-enzimáticas. Dentre as enzimáticas, as principais são: as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat) e glutatona peroxidase (GPx). As principais defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula são as vitaminas C e E, carotenóides,

flavonóides, pigmentos biliares, urato e os tióis, todos sendo captadores de radicais. Os tióis podem ser proteicos, tendo um papel mais importante na estrutura da celular, e não proteicos, sendo muito importantes na defesa antioxidante. Dentre os tióis não proteicos, o mais estudado é o tri peptídeo glutathiona (GSH), composto por gama-glutamil-cisteinil-glicina, atuando contra a formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos. Essa capacidade antioxidante se dá pelo grupamento tiol (SH) reativo de sua cisteína, o qual também pode ser encontrado em proteínas (PSH) ou em tióis não proteicos de baixo peso molecular (NPSH), como a cisteína e a GSH (REISCHL et al., 2007).

Desta forma, a partir de um balanço entre as defesas antioxidantes e os efeitos tóxicos das ERO em biomoléculas, é possível manter o metabolismo e o funcionamento celular inalterados. Entretanto, em situações específicas, pode haver excesso de produção de ERO, falha das defesas antioxidantes ou ambos, gerando estresse oxidativo. As consequências do estresse oxidativo podem variar de acordo com o tipo celular e com sua intensidade. Os principais efeitos são proliferação celular, adaptação (aumento das defesas celulares), dano celular, senescência celular (sistema de divisão comprometido) e morte celular (apoptose ou necrose) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

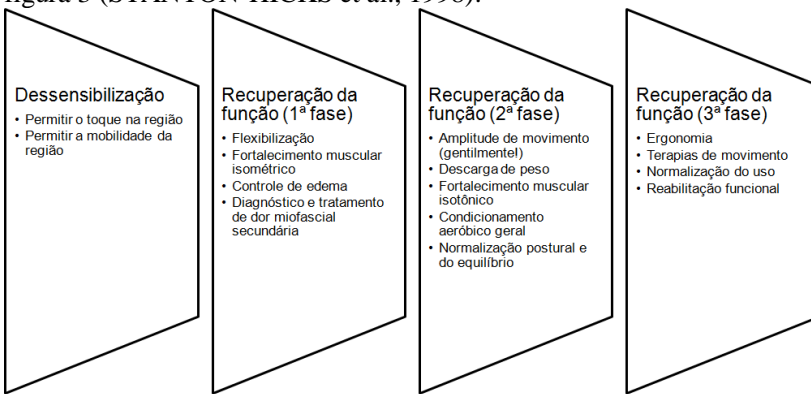
A literatura mostra uma relação clara entre o estresse oxidativo e os danos causados pela lesão de isquemia e reperfusão. Durante a isquemia, a mitocôndria tem parte da funcionalidade afetada e há redução seqüencial do oxigênio que leva a produtos intermediários. Os produtos intermediários do oxigênio não são completamente reduzidos e, portanto, são bastante reativos (ERO). A concentração destas ERO é limitada em tecidos não isquêmicos graças ao balanço feito pelas defesas antioxidantes (FERRARI et al., 1991). Um exemplo da quebra deste balanço pode ser observado no estudo utilizando ratos, os quais receberam um torniquete no tornozelo por três horas com posterior liberação do fluxo sanguíneo. Assim, podem-se observar no músculo da pata destes animais, níveis elevados de malondialdeído (produto da lipoperoxidação induzida por radicais livres) (CODERRE; BENNETT, 2010) e de lactato (LAFERRIÈRE et al., 2008). Além disso, quando tratados com antioxidantes (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil – Tempol ou N-acetil-L-cisteína – NAC), estes animais apresentaram redução da hipersensibilidade mecânica causada pela lesão (CODERRE; BENNETT, 2010).

1.5 INFLAMAÇÃO EM MODELO DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL

Os radicais livres danificam células endoteliais de capilares e vênulas, estimulando-os a liberar inúmeros mediadores pró-inflamatórios. Eles aumentam a expressão de moléculas quimiotáticas que recrutam monócitos, leucócitos e plaquetas que se acumulam e ocluem os capilares e liberando fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Esta oclusão gera um fenômeno conhecido como *slow-flow/no-reflow* (“*slow-flow*” se refere à oclusão parcial do lúmen do vaso sanguíneo que diminui o fluxo de sangue, enquanto a oclusão completa do vaso com interrupção do fluxo é chamada de “*no-reflow*”), o qual se acredita ser um ponto chave na SDCR tipo I em humanos e na DPIC em animais. Neste fenômeno ocorre o edema de células endoteliais de micro vasos, agregação plaquetária e oclusão do lúmen do capilar por leucócitos e eritrócitos. Há evidências de que em ratos com DPIC, as células dos capilares da pele, músculos, nervos, periósteo e osso intramedular são atingidos pelo fenômeno de *slow-flow/no-reflow*. Na pele, entretanto, os capilares são extremamente densos devido ao seu papel importante na termorregulação, o que os torna relativamente resistentes. Corroborando com estas evidências, os níveis de TNF- α , IL-1, IL-6 e fator nuclear kappa B (NF κ B) estão elevados no músculo da pata de ratos submetidos à DPIC, sugerindo que há geração de citocinas pró-inflamatórias dependente de NF κ B, tendo papel fundamental na DPIC (CODERRE; BENNETT, 2010). Pesquisas sobre a inflamação em humanos com SDCR comparam níveis de TNF- α e IL-6 encontrando aumento nos níveis de citocinas apenas nos casos agudos (HUYGEN et al., 2002). Além disso, outro estudo clínico não encontrou diferença nos níveis de TNF- α e IL-6, apesar de alguns pacientes ainda apresentarem sinais de inflamação (WESSELDIJK et al., 2008a). Portanto, não se observa relação entre os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e as principais características da SDCR, como sua duração, dor e mudanças na temperatura local (WESSELDIJK et al., 2008a; WESSELDIJK et al., 2008b).

1.6 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO I

Ainda não existe protocolo de tratamento para SDCR tipo I bem aceito. Os tratamentos variam e incluem fisioterapia, bloqueio dos nervos simpáticos, antidepressivos tricíclicos, opióides, anticonvulsivantes e tratamento psicológico (ALLEN; GALER; SCHWARTZ, 1999). Para contrabalançar esta abordagem tão heterogênea e tendo-se o consenso de que a recuperação funcional deve ser o alvo final do tratamento cujo algoritmo deve contar inicialmente com a dessensibilização, conforme a figura 3 (STANTON-HICKS et al., 1998):



*Se não for possível realizar qualquer passo devido a dor → considerar bloqueio e/ou mudança de medicamento

** Comportamento doloroso frequentemente inconsistente ou exacerbado

Figura 3 – Diagrama das fases contidas no algoritmo de tratamento da SDCR I. A lista de cada modalidade não implica uma ordem específica de prioridade. Cada intervenção deve ser feita de acordo com a progressão do paciente.

Fonte: Adaptada de Stanton-Hicks et al. (1998).

Pode haver necessidade de tratamento psicológico em caso de superproteção irracional do movimento ou problemas psiquiátricos como depressão. Também é indicado o tratamento farmacológico caso a dor seja um fator limitante na aquisição do progresso do tratamento (STANTON-HICKS et al., 1998). Neste sentido, Ribbers e colaboradores (2003) trazem a possibilidade de tratar a dor de acordo com os possíveis mecanismos da SDCR tipo I, que estão relacionados na tabela 2:

Tabela 2 – Tratamento farmacológico baseado em possíveis mecanismos da SDCR tipo I

Sintomas	Mecanismos	Alvos farmacológicos	Fármacos (classes)
Dor espontânea	Sensibilização periférica	Inflamação regional Canais iônicos Modulação medular da dor Sistema nervoso simpático	Corticosteróide Antioxidante AINE ATC ISRS Anticonvulsivo Anestésico Capsaicina Opióide Tramadol Clonidina ATC Gabapentina Guaneditina Bretilium Quetanserina Quetamina Amantadina
Dor evocada por estímulo	Sensibilização central	Receptor NMDA	Quetamina Amantadina

Abreviações: AINE, anti inflamatório não esteroidal; ATC, antidepressivo tricíclico; ISRS, inibidor seletivo da recaptação de serotonina.

FONTE: Adaptado de Ribbers et al. (2003).

Em estudo realizado com ratos submetidos a modelo experimental de SDCR tipo I por IR da pata que foram tratados dois e sete dias após IR, o tratamento sistêmico com drogas anti inflamatórias (acetaminofeno, anti inflamatório não esteroidal (AINE); ibuprofeno, AINE e dexametasona, corticosteróide) não foi capaz de diminuir a hipersensibilidade mecânica em nenhum dos tempos testados, exceto com dexametasona na maior dose durante o estágio inicial da dor (10 mg/kg, i.p., dois dias após IR). O tratamento destes animais com amitriptilina (antidepressivo tricíclico – ATC) também não diminuiu a hipersensibilidade mecânica em nenhum dos tempos testados. Já o tratamento com morfina (opióide – 3 mg/kg, i.p.) foi capaz de reduzir de forma significativa esta hipersensibilidade dois dias após IR e o tratamento com pregabalina (anticonvulsivo análogo a gabapentina – 50 e 100 mg/kg, i.p.) apresentou diminuição ainda maior, dois e sete dias após IR (CODERRE; BENNETT, 2008).

1.7 EXERCÍCIO FÍSICO (NATAÇÃO)

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

Atualmente sabe-se que a prática de exercícios físicos exerce benefícios tanto para a saúde física quanto mental. Ela reduz a incidência de doenças como câncer, diabetes, doenças cardíacas e osteoporose (COTMAN; BERCHTOLD; CHRISTIE; 2007; BOOTH, 2002), além de promover neuroproteção, neuroplasticidade (HAYES et al., 2008), melhora da cognição, atividade ansiolítica e antidepressiva (COTMAN; BERCHTOLD; CHRISTIE, 2007), e capacidade de influenciar o limiar nociceptivo (KUPHAL; FIBUCH; TAYLOR, 2007; MAZZARDO-MARTINS et al., 2010). De maneira inversa, um estilo de vida sedentário é um fator de risco para doenças cardiovasculares e outros quadros crônicos, como diabetes mellitus, câncer (cólon e reto), hipertensão arterial e depressão (DISHMAN et al., 2006).

No entanto, o exercício físico pode gerar aumento na produção de ERO, assim como a ingestão excessiva de nutrientes ou a exposição a poluentes. Isso porque em qualquer situação em que haja aumento do consumo de oxigênio, há um estado agudo de estresse oxidativo. A geração primária de ERO em resposta ao exercício agudo pode ocorrer de diversas formas, entre elas: respiração mitocondrial, auto oxidação de catecolaminas e atividade enzimática de oxidases como NAD(P)H oxidase e xantina oxidase. O aumento inicial das ERO durante o exercício associado ao repouso posterior pode levar a geração secundária de pró-oxidantes, com a consequente perda da homeostase de cálcio e destruição de proteínas. Desta forma, a exposição repetida aos aumentos de ERO causada pelo exercício físico crônico resulta no aumento do sistema de defesas antioxidantes do corpo. Além disso, há uma mudança associada no balanço redox (equilíbrio entre a oxidação e a redução) favorecendo um ambiente redutor, o que significa a melhora das defesas antioxidantes. Esta melhora leva a uma proteção adaptativa das ERO durante as sessões subsequentes de exercício, estendendo-se a condições de estresse oxidativo não relacionadas a exercício, como é o caso da isquemia (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

A natação é uma das formas de exercício físico mais praticado em todo o mundo, sendo que nos Estados Unidos é a segunda modalidade

de exercício dinâmico mais popular, ficando atrás somente de caminhadas (BOOTH et al., 1997; US CENSUS BUREAU, 2009). Com o intuito de compreender seus efeitos, têm sido realizados estudos experimentais sobre o exercício físico de natação em roedores (KUPHAL; FIBUCH; TAYLOR, 2007).

A natação é uma forma atrativa de exercício físico, por ser relativamente acessível. A descarga de peso corporal é significativamente diminuída, reduzindo as forças compressivas sobre as articulações quando comparadas as de exercícios físicos praticados no solo e, como consequência, diminuindo o impacto sobre o sistema músculo-esquelético e lesões (BECKER; COLE, 1988). Sendo assim, a natação é uma forma ideal de exercício físico para pacientes obesos, idosos e com artrite. Entretanto, surpreendentemente pouco se sabe sobre os efeitos induzidos pela natação regular sobre a promoção da saúde e prevenção de doenças (TANAKA, 2009).

Quando se trata da prática de exercício físico, alguns princípios de treinamento determinam a adaptação ao treino (ou volume) e devem ser levados em consideração, como: a intensidade, a frequência, a duração e o modelo de exercício, que redundam em um programa. A intensidade refere-se ao nível de dificuldade do exercício; a frequência, ao número de sessões; e a duração, ao período de tempo durante o qual o indivíduo esteve em treinamento, ou à duração de uma única sessão de exercício (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000; FOSS; KETEVIAN, 2000).

Em relação à intensidade do exercício físico, três métodos podem ser usados para determiná-la: frequência cardíaca, nível de lactato sanguíneo e ritmo/velocidade do treinamento (FOSS; KETEVIAN, 2000). Quando se trata de nível de lactato, leva-se em consideração a máxima fase estável de lactato (MFEL) que é conceituada como a maior concentração de lactato sanguíneo na qual o equilíbrio entre sua formação e eliminação pode ser atingido durante o exercício prolongado com carga constante. Isso acontece quando a intensidade do exercício é tão alta que a taxa de glicólise excede a utilização mitocondrial do piruvato, causando o acúmulo do lactato (FERREIRA et al., 2007).

Levando em consideração o lactato sanguíneo, Gaesser e Poole (1996) propõem três domínios em relação à intensidade de esforço: moderado, pesado e severo. O domínio moderado compreende todas as intensidades de esforço que podem ser realizadas sem a modificação do lactato sanguíneo em relação aos valores de repouso. O domínio pesado começa a partir da menor intensidade de esforço onde o lactato se eleva, e tem como limite superior a intensidade correspondente à MFEL. Para

o domínio severo, não existe fase estável de lactato sanguíneo, com este se elevando durante todo o tempo de esforço, até que o indivíduo entre em exaustão.

É possível entender claramente que a MFEL pode se alterar. De fato, Aguiar Jr e colaboradores (2010) demonstraram que camundongos submetidos ao treino com exercício físico (esteira) de alta intensidade (domínio severo) apresentaram diminuição nos níveis de lactato quando comparados ao início do treinamento. Isto significa que houve uma diminuição no acúmulo de lactato, o que indica proteção adaptativa do exercício através do aumento no metabolismo oxidativo.

2 JUSTIFICATIVA

A síndrome da dor complexa regional tipo I (SDCR tipo I) é uma dor crônica geralmente desenvolvida após lesão de tecidos profundos, como uma fratura. Apesar de rara, com incidência de 26,20 por 100.000 pessoas (DE MOS et al., 2007), a síndrome tem sinais e sintomas como dor espontânea em queimação, uma variedade de sensações dolorosas evocadas por estímulos anormais (alodínia e hiperalgesia) e disfunções vasomotoras e sudomotoras (CODERRE; BENNETT, 2010) que dificultam muito a realização das atividades de vida diárias (AVDs) dos pacientes. No entanto, apesar de tamanho impacto na qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela síndrome, sua causa ainda não está totalmente esclarecida (CODERRE; BENNETT, 2010). Além disso, a sua definição torna-se difícil na prática clínica, quando se conta apenas com estudos isolados. A falta de conhecimento científico específico dentro desta área deve-se muito a dificuldade de realização de estudos randomizados e controlados.

Muitas das terapias atuais são utilizadas com intuito puramente analgésico, sem que se trate a causa. No entanto, normalmente não induz alívio da dor associada à SDCR tipo I que é muito grave. Por outro lado, sabe-se que diversos programas de atividades físicas são empiricamente empregados em pacientes com dores neuropáticas, muitas vezes baseados apenas na experiência do terapeuta, podendo apresentar remissão de até 97% da dor, como ocorreu no estudo feito com crianças com SDCR tipo I (STANTON-HICKS, 2010). Portanto, a busca por terapias capazes de trazer efetivamente efeitos analgésicos a este tipo de paciente é um desafio que se atribui ao exercício físico.

Diante disso, fornecer informações através de análises bioquímicas, funcionais e sensoriais a respeito da SDCR e da atividade antinociceptiva que o exercício físico de alta intensidade exerce sobre a mesma é imprescindível, a fim de clarificar de que forma o exercício físico exerce influência sobre a dor. Além disso, fornecer informações adicionais sobre estes mecanismos é de profunda valia para o desenvolvimento de um tratamento preventivo eficaz, bem como para uma abordagem terapêutica mais adequada.

Neste sentido, o presente trabalho propõe-se a caracterizar um modelo de SDCR tipo I em camundongos e a avaliar a influência do exercício físico sobre a dor crônica inflamatória e neuropática, relacionada este modelo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o modelo experimental de SDCR tipo I por isquemia e reperfusão da pata (IR), através da avaliação funcional (sensorial) e de análises bioquímicas e histológicas em camundongos. Além disso, verificar os efeitos do exercício de natação de alta intensidade sobre a lesão por IR da pata em camundongos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os seguintes parâmetros no modelo de SDCR tipo I em camundongos:

- O perfil temporal da variação da temperatura e da formação e resolução do edema na pata; e verificar os efeitos da natação sobre estes perfis temporais;
- O limiar sensorial (mecânico e térmico ao frio); e verificar o efeito da natação sobre este limiar;
- Os níveis de citocinas anti- e pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) na medula espinal e na pele da superfície plantar pata;
- Os níveis de tióis proteicos e não proteicos na medula espinal e na pele da superfície plantar pata; e verificar o efeito da natação sobre estes níveis;
- O envolvimento de radicais livres na hipersensibilidade mecânica induzida pela IR, através do tratamento com N-acetil-L-cisteína;
- O componente nociceptivo no segundo e sétimo dia após IR, através do tratamento dos animais nos respectivos dias com ibuprofeno (inibidor de ciclo-oxigenase), dexametasona (corticoesteróide), morfina (opióide) ou gabapentina (anticonvulsivante).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização deste trabalho, foram utilizados camundongos Swiss machos (25 a 35 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, aclimatados a $(22 \pm 2) ^\circ \text{C}$, no ciclo 12h-claro / 12h-escuro (claro a partir das 6:00 h.), com acesso a ração e água *ad libitum*. Os animais foram homogeneamente distribuídos entre os grupos e aclimatizados no laboratório por pelo menos uma hora antes dos testes, sendo utilizados somente uma vez em cada experimento.

Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo CEUA/PP00509 pelo comitê de ética institucional da UFSC (Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA), estando de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes (ZIMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram o mínimo necessário para demonstrar a consistente instalação do processo hipernociceptivo.

Além disso, o trabalho contou com duas fases de experimentos. Na primeira fase, foram utilizados 405 animais para realização de análises comportamentais, histológicas e bioquímicas em diferentes tempos com a finalidade de padronizar o modelo de IR da pata em camundongos, conforme demonstrado na figura 4.

Na segunda fase, foram utilizados 750 animais e foi realizado o tratamento com exercício físico de alta intensidade (natação) com avaliações comportamentais e bioquímicas em diferentes tempos para verificar os efeitos do exercício sobre a lesão.

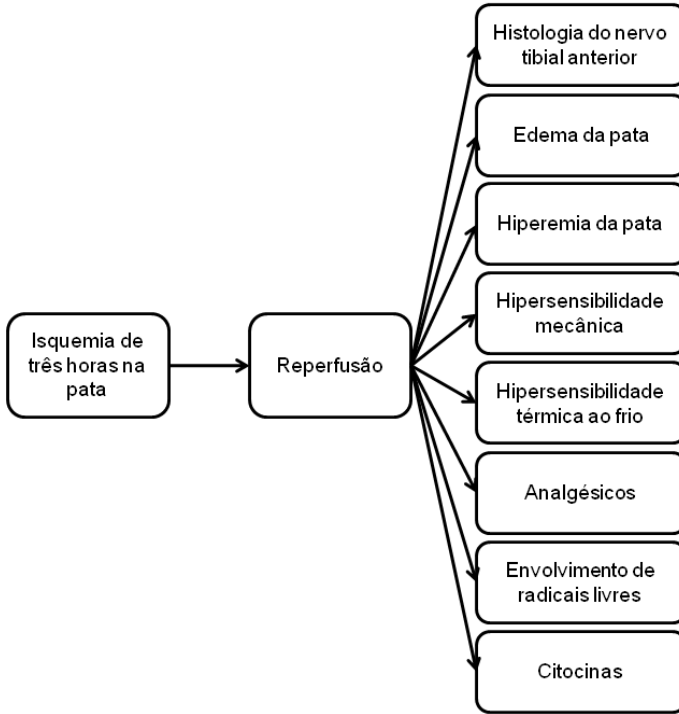


Figura 4 – Esquema de padronização da lesão por IR da pata em camundongos.

4.2 INDUÇÃO DA LESÃO POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO (IR) NA PATA

Para realização da isquemia, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg) (QUINTÃO et al., 2006). Após a verificação da perda do estado de consciência do animal (através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), posicionou-se um anel elástico com 1,2 mm de diâmetro interno (Elástico Ligadura 000-1237 Uniden – figura 5) proximal a articulação do tornozelo direito de modo a fazer um torniquete. O animal foi mantido sob anestesia com reforços de 20% do volume inicial por três horas e então o anel foi cortado permitindo a reperfusão da pata. Após a isquemia, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada até retornarem a deambular pela caixa, voltando posteriormente para o biotério do laboratório.



Figura 5 – Anéis elásticos.

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Para confirmar se o modelo representa SDCR tipo I, foi realizada a análise histológica e morfométrica para verificação da ausência de lesão nervosa. Para isto, foram avaliados os nervos de dois grupos:

- Grupo 1 – Naive (N): 5 camundongos;
- Grupo 2 – Isquemia e reperfusão da pata (IR): 5 camundongos.

4.3.1 Preparação das amostras

No sétimo dia após a IR da pata, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂. O nervo tibial anterior foi retirado através de incisão na região interna da perna direita do animal, após a secção do músculo tibial anterior.

As amostras foram fixadas em solução de formalina zinco (cloreto de zinco 1,6%; formaldeído 4,0%; acetato de cálcio 20,0%) durante 24 horas. Após a fixação, as amostras foram colocadas em dicromato de potássio a 5,0% por cinco dias. Passado esse período, as amostras foram lavadas em água corrente e deixadas na água por toda noite para retirar todo o dicromato antes da desidratação gradual com etanol. Em seguida, foi seccionado um segmento de cada nervo de (5,0 ± 0,5) mm, 3,0 mm distal à lesão. Depois de cuidadosa desidratação em etanol, foi utilizada a metodologia de rotina (CARGNIN-FERREIRA; SARASQUETE, 2008), para a inclusão em parafina 58°C, utilizando como líquido intermediário o xilol e levando a cabo as seguintes pautas: desidratação e inclusão em parafina: etanol 70% (mínimo 24 horas), etanol 80% (45 minutos), etanol 90% (45 minutos), etanol absoluto 100% I (45 minutos), etanol absoluto II (45 minutos), etanol-xilol 1/1

(45 minutos), xilol I (45 minutos), xilol II (45 minutos), parafina I (1 hora), parafina II (1 hora), parafina III (1 hora).

Após inclusão vertical do material em parafina e emblocamento, os mesmos foram cortados em micrótomo Leica RM 2025 com espessura de 5 μm . Os cortes foram então estirados e recolhidos em um banho termostático a 52 °C e dispostos sobre lâminas gelatinizadas para sua fácil adesão. Os cortes obtidos foram desparafinizados e hidratados segundo a metodologia de rotina e corados com azul de toluidina 1,0 %. As lâminas com os cortes foram então lavadas para retirada do excesso de corante, desidratadas e montadas em meio de montagem aquoso.

4.3.2 Morfometria

Os critérios de seleção dos cortes foram a integridade da morfologia do nervo, particularmente do perineuro, qualidade da coloração, ausência de artefatos de técnicas (rachaduras, dobras). Depois de corados, os cortes foram observados e fotografados com microscopia de luz e foi quantificada a densidade de fibras mielinizadas (fibras/ mm^2) em aumento de 1000x. Para isso, foram escolhidas duas a três áreas representativas de cada corte analisado, onde foram contados os axônios e divididos pela medida da área.

4.3.3 Tratamento das imagens

A análise histológica foi realizada em corte transversal da porção distal do nervo direito restrita ao tecido conjuntivo e à área de bainha mielinizada. As imagens foram adquiridas usando-se câmera digital de microscopia modelo TA – 0124-A, conectada a um microscópio de luz DME (Leica). As imagens foram capturadas em aumento de 1000x e ampliadas mais 200x para análise, pelo Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland). Posteriormente, as imagens foram analisadas em programa de imagem (Chtool) desenvolvido pelo Projeto Cyclops (Depto. de informática – UFSC) para análises histopatológicas para o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário. Contrariamente aos procedimentos em análises de imagens histológicas, onde se convertem as imagens policromáticas em uma escala de cinza e se analisam quantitativamente áreas de interesse, o programa atualmente desenvolvido analisa as imagens policromáticas diretamente, resultando em maior precisão nas quantificações planimétricas das alterações histopatológicas, visto que integram distintas matizes de cor derivados das técnicas de coloração utilizadas.

4.4 MENSURAÇÃO DO EDEMA E TEMPERATURA DA PATA

Para medir a espessura da pata, utilizou-se um paquímetro universal (Starrett modelo: 125MEB-6/150 – figura 6) posicionando a parte fixa na superfície dorsal e a parte móvel do paquímetro na superfície plantar, imediatamente proximal aos dedos do animal. Foi realizada uma medida em cada pata. O edema foi representado pela diferença entre a medida da pata que recebeu e da que não recebeu o torniquete.



Figura 6 – Paquímetro.

A hiperemia foi verificada também através da diferença da medida das patas. Para isso, mediu-se uma vez a temperatura da superfície dorsal de cada pata com a utilização de um termômetro digital (Mallory modelo: Thermosensor Pro – figura 7).



Figura 7 – Termômetro utilizado para avaliar a temperatura local.

Para avaliar o edema e a temperatura da pata, os animais foram divididos em três grupos:

- Grupo 1 – Naive (N): 15 camundongos sem manipulação prévia as avaliações;
- Grupo 2 – Falso-operado (FO): 15 camundongos que tiveram seu tornozelo envolto pelo anel já cortado, permanecendo anestesiados por três horas (usados como controle da anestesia);
- Grupo 3 – Isquemia e reperfusão da pata (IR): 15 camundongos submetidos a IR da pata, permanecendo anestesiados com hidrato de cloral tendo o tornozelo envolto pelo anel de borracha por três horas com liberação do fluxo sanguíneo antes do fim da anestesia.

As mensurações do edema (espessura da pata) e da hiperemia (temperatura da pata) foram realizadas na seguinte sequência temporal: pré e pós IR por até sete dias, conforme esquema presente na figura 8. As medidas foram obtidas de cada grupo e expressas pela diferença do valor obtido entre a pata direita e a esquerda.

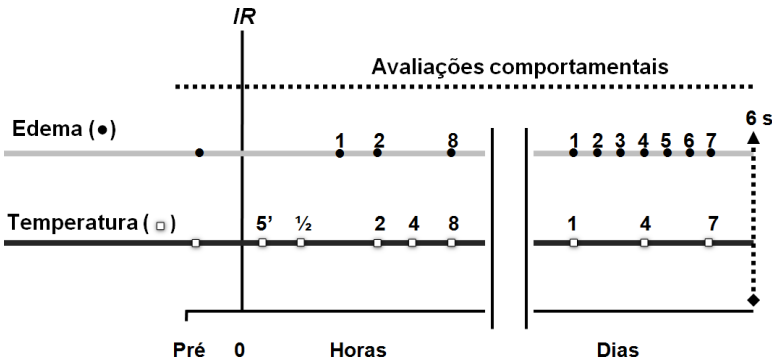


Figura 8 – Esquema dos tempos em que foram realizadas as medidas do edema e da temperatura.

4.5 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA

A avaliação da hipersensibilidade mecânica foi realizada através do teste de von Frey de acordo com o método *up and down* modificado por Chaplan e colaboradores (1994). Para isto, os animais foram divididos em três grupos, conforme descrito no item 4.4. Os filamentos de von Frey com carga entre 0,02 g e 4,00 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA) foram aplicados na superfície plantar dos animais com aumento

ou diminuição da carga, conforme a resposta, para determinar o filamento mais próximo do limiar de retirada da pata. Com base no perfil de resposta e na força do último filamento, foi calculado o valor de 50% do limiar de retirada da pata em gramas. O perfil de resposta positiva ou negativa foi obtido utilizando a convenção de (x = retirada da pata) e (o = ausência de resposta) e o valor de 50% do limiar de retirada foi interpolado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\mathbf{50\% \text{ do limiar de retirada} = \frac{10^{(X_f + k\delta)}}{10000} [g]}$$

X_f = valor logarítmico do último filamento de von Frey utilizado;
 K = valor da tabela para o perfil de respostas positivas e negativas;
 δ = diferença média entre os estímulos em unidades logarítmicas;
 limiar = quantificado em gramas [g].

Realizou-se o teste utilizando uma plataforma (figura 8) de (70 cm × 40 cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 cm × 7 cm × 11 cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (PITCHER; HENRY, 2004).

Aplicou-se o filamento na pata posterior que sofreu isquemia, atendendo alguns critérios como: a aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento (figura 9), obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio.



Figura 9 – Avaliação da hipersensibilidade mecânica com o filamento de von Frey.

De acordo com a figura 10, no dia anterior a isquemia, os animais foram submetidos ao teste para determinação da resposta basal. Após a isquemia, as avaliações foram feitas todos os dias na primeira semana e, a partir da segunda semana, uma vez por semana até quando os animais submetidos a IR tiveram os seus limiares normalizados, semelhantes aos valores basais (seis semanas).

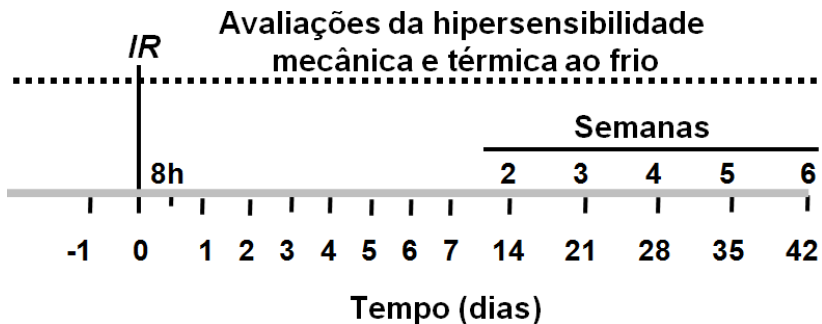


Figura 10 – Esquema dos tempos das análises da hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio.

4.6 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO

Para avaliação hipersensibilidade ao estímulo térmico frio utilizou-se o método da placa fria (CQF/AVS – Brasil – figura 11) como descrito anteriormente (BENNETT; XIE, 1988), com poucas modificações. Os animais foram divididos em três grupos (conforme descrito no item 4.4.) e ambientados sobre a superfície da placa a temperatura ambiente por cinco minutos durante sete dias antes do início dos experimentos, para minimizar o estresse causado pelo novo ambiente. No momento do teste os camundongos foram colocados individualmente sobre a placa fria ($10,0 \pm 0,5$) °C contidos por um cilindro de acrílico (40 cm de altura por 20 cm de diâmetro). O tempo de retirada ou lambida da pata traseira direita (comportamentos indicativos de desconforto) foi considerado como a latência para a resposta nociceptiva. O animal foi retirado da placa fria após dois minutos do início do teste para evitar danos teciduais.

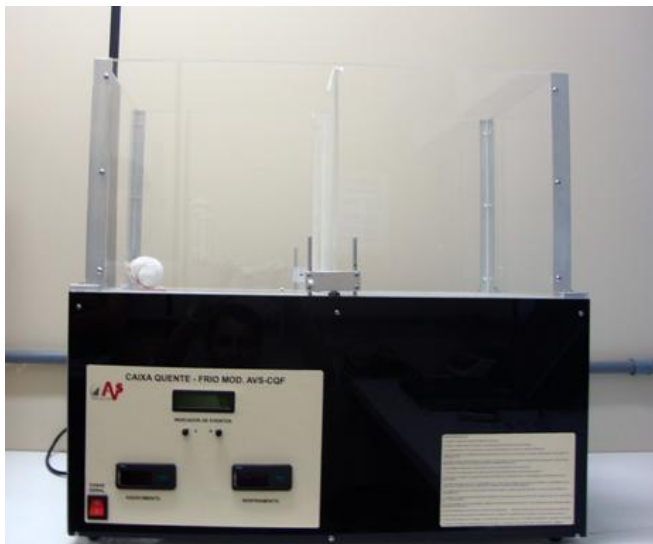


Figura 11 – Aparelho de placa quente e fria utilizado para avaliar a hipersensibilidade térmica ao frio (10°C).

No dia anterior ao início da isquemia, os animais foram submetidos ao teste para determinação da resposta basal. Após a IR, as avaliações foram realizadas todos os dias na primeira semana e, a partir da segunda semana, até quando os animais submetidos a IR tiveram os seus limiares normalizados, semelhante aos valores basais (seis semanas – ver figura 10).

4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

No sexto dia após IR, os animais já divididos em três grupos (conforme descrito no item 4.4.) foram sacrificados por decapitação, a região lombar (L1 – L5) da medula espinal e a pele da superfície plantar da pata direita foram rapidamente removidas e armazenadas de forma adequada para cada dosagem.

4.7.1 Determinação dos níveis de citocinas

Os níveis teciduais de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 foram avaliados como descrito anteriormente (CAMPOS et al., 2002) com poucas modificações. Estas análises foram realizadas a partir de amostras removidas e homogeneizadas com PBS contendo tween 20

0,05 %, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 0,1 mM, EDTA 10,0 mM, aprotinina 2,0 ng/ml e cloreto de benzametônio 0,1 mM. A solução formada foi centrifugada a $3.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante será armazenado a - 70 ° C por no máximo duas semanas. Os níveis das citocinas foram determinados utilizando-se Kits específicos de ELISA (R&D systems) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7.2 Determinação dos níveis de tióis

Os tecidos retirados foram rapidamente homogeneizados em 1,0 ml de EDTA 0,02 M e mantidos em gelo em todos os demais procedimentos. O homogenato foi centrifugado a $4000 \times g$ por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi então dividido em duas alíquotas de 300 ml (A e B). A alíquota A foi utilizada para determinar os níveis de tióis totais. A alíquota B foi encubada com 50 ml de TCA 50% a 4°C por 60 minutos e então centrifugada a $12000 \times g$ por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para determinar o nível de tióis não-proteicos de cada amostra. Para determinar os níveis de tióis totais, 200 ml de Tris/HCl (200 mM, pH 8,9) e 20 ml de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitro-benzóico) (DTNB) (2,5 mM) foram adicionados a 100 ml de cada amostra em uma placa de Elisa e incubados a temperatura ambiente por cinco minutos. Para determinar a curva padrão de tióis (SH), foi utilizada cisteína (aminoácido com grupo tiólico que compõe a glutatona). A cor da solução resultante das reações foi medida utilizando o comprimento de onda de 405 nm em espectrofotômetro (R&D systems). Os tióis proteicos foram calculados subtraindo os valores dos níveis de tióis não proteicos dos de tióis totais.

4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ALGUNS ANALGÉSICOS

Os camundongos foram submetidos ao teste de von Frey (descrito no item 4.4) antes da cirurgia para determinação do limiar de retirada da pata basal e, no segundo e sétimo dia após a IR, foram submetidos ao tratamento com diferentes tipos de analgésicos.

Para avaliar os efeitos de cada fármaco sobre a hipersensibilidade mecânica, os animais foram divididos em sete grupos:

- Grupo 1 – Naive (N): 15 camundongos;
- Grupo 2 – Falso-operado (FO): 15 camundongos;
- Grupo 3 – Isquemia e reperfusão da pata (IR): 15 camundongos;

- Grupo 4 – IR + ibuprofeno (IRI): 15 camundongos foram submetidos a IR da pata, sendo tratados no segundo e no sétimo dia com ibuprofeno (200 mg/kg, i.p.);
- Grupo 5 – IR + dexametasona (IRD): 15 camundongos foram submetidos a IR da pata, sendo tratados no segundo e no sétimo dia com dexametasona (10 mg/kg, i.p.);
- Grupo 6 – IR + morfina (IRM): 15 camundongos foram submetidos a IR da pata, sendo tratados no segundo e no sétimo dia com morfina (3 mg/kg, i.p.);
- Grupo 7 – IR + gabapentina (IRG): 15 camundongos foram submetidos a IR da pata, sendo tratados no segundo e no sétimo dia com gabapentina (100 mg/kg, i.p.).

Em cada tratamento, foram realizadas uma avaliação prévia e quatro ou cinco avaliações posteriores (30, 45, 60, 90 e 180 minutos ou 30, 45, 90 e 180 minutos após o tratamento), conforme a figura 12. Os analgésicos utilizados foram ibuprofeno, dexametasona, morfina e gabapentina, sendo administrados por via intraperitoneal. As doses e o tempo após a avaliação foram baseados na farmacocinética de cada fármaco, conforme descrito por Millecamps e Coderre (2008). O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina – 10 ml/kg, i.p.), e foi avaliado nos mesmos tempos.

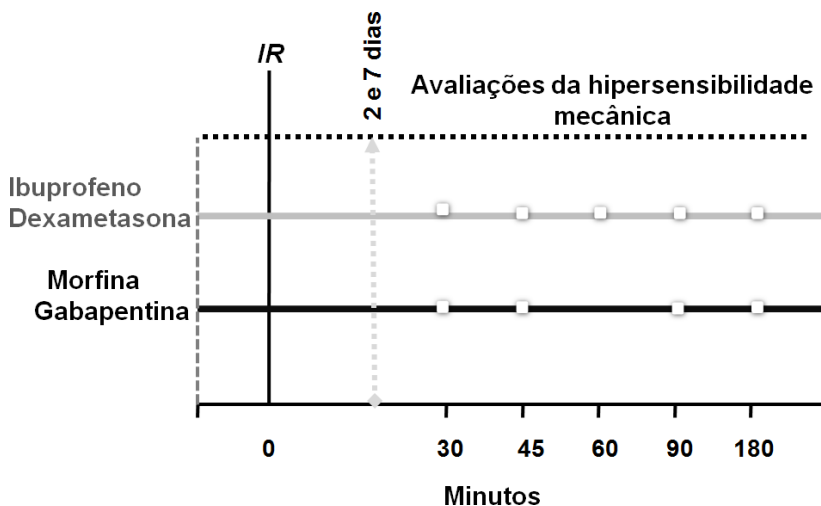


Figura 12 – Esquema dos tempos em que foram realizadas as avaliações de hipersensibilidade mecânica após a administração dos analgésicos no segundo e no sétimo dia após IR.

Os mesmos animais foram utilizados no segundo e no sétimo dia, pois conforme descrito por Millecamps e Coderre (2008), cinco dias são suficiente para que o animal elimine os resíduos dos fármacos.

4.9 VERIFICAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

Para estabelecer o potencial efeito anti-hipersensibilidade mecânica de *scavengers* de radicais livres, os camundongos receberam N-acetil-cisteína (NAC) (500 mg/kg, i.p.) e a hipersensibilidade mecânica de retirada da pata foi avaliada através do filamento de von Frey, descrito no item 4.4. Para avaliar os efeitos de cada tratamento sobre a sensibilidade mecânica da pata, os animais foram divididos em quatro grupos:

- Grupo 1 – IR + Veículo (IRV): 15 camundongos foram submetidos a IR da pata, sendo tratados no segundo e no sétimo dia com veículo (10 ml/kg, i.p.);
- Grupo 2 – IR + NAC (IRNAC): 15 camundongos foram submetidos a IR da pata, sendo tratados no segundo e no sétimo dia com NAC (500 mg/kg, i.p.).

Após a avaliação basal, os animais foram submetidos a IR. Dois e sete dias após a IR, os animais foram testados antes e em diferentes tempos após a administração de NAC, conforme a figura 13.

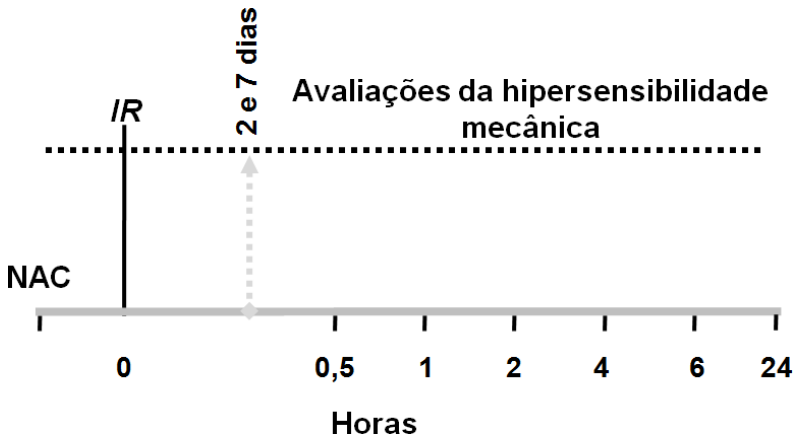


Figura 13 – Tempos das análises do limiar mecânico de retirada após a administração de NAC no segundo e sétimo dias após IR.

4.10 NATAÇÃO

Para realizar a natação, os animais foram colocados em uma caixa plástica contendo aproximadamente 35 litros de água, medindo 540 mm × 390 mm × 325 mm, dividida com acrílico, em oito compartimentos de 170 mm × 110 mm cada (figura 14). A água foi mantida aquecida a 37°C. Sabão líquido foi acrescentado (1 ml por compartimento, totalizando 8 ml) reduzindo, desta forma, a tensão superficial da água, evitando o comportamento de ‘boiar’. Portanto a quantidade de sabão líquido na água foi de 229 µl/l. Após cada sessão de natação os animais foram gentilmente secos com toalhas de tecido (MAZZARDO-MARTINS et al., 2010).

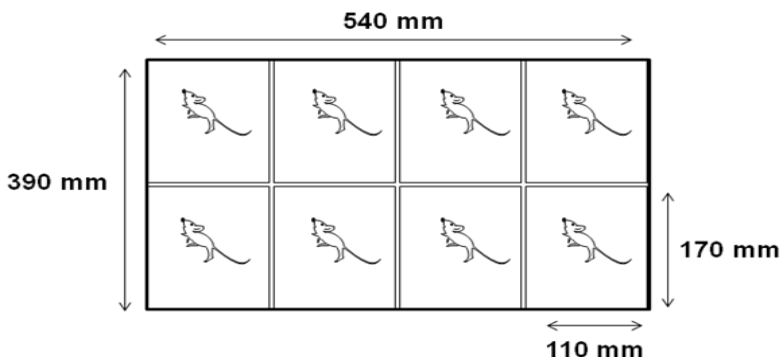


Figura 14 – Representação da caixa plástica utilizada pelos camundongos para prática da natação.

O recipiente apresenta as seguintes medidas: 540 mm × 390 mm × 325 mm; sendo dividido com acrílico em oito compartimentos de 170 mm × 110 mm cada.

Fonte: Mazzardo-Martins et al. (2010).

O exercício físico de alta intensidade (natação) utilizado neste trabalho foi o descrito por Mazzardo-Martins e colaboradores (2010) com pequenas modificações. Dez grupos fizeram parte da avaliação dos efeitos comportamentais do exercício sobre a IR:

- Grupo 1 – Naive (N): 15 camundongos;
- Grupo 2 – Falso-operado (FO): 15 camundongos;
- Grupo 3 – Isquemia e reperfusão da pata (IR): 15 camundongos;
- Grupo 4 – Natação antes da IR (NIR): 15 camundongos submetidos a natação e posteriormente a IR da pata (oitavo dia após o início da natação, sendo dois dias de adaptação);

- Grupo 5 – Natação após a IR (IRN): 15 camundongos submetidos a IR da pata. 24 horas após a IR, os animais foram submetidos a natação por sete dias (dois dias de adaptação);
- Grupo 6 – Natação antes e após a IR (NIRN): 15 camundongos submetidos a natação com a realização da IR da pata no oitavo dia e repetição do protocolo de natação por mais cinco dias (sem necessitar nova adaptação);
- Grupo 7 – Água rasa antes e após a IR (IRRaso): 15 camundongos submetidos ao ambiente aquático sem exercício físico, com água até a altura da cabeça do fêmur nos mesmos dias que o grupo 6;
- Grupo 8 – Somente exercício de natação antes (NA): 15 camundongos submetidos a natação realizada ao mesmo tempo em que o grupo 4 sem lesão por IR na pata;
- Grupo 9 – Somente exercício de natação depois (ND): 15 camundongos submetidos a natação realizada ao mesmo tempo em que o grupo 5 sem lesão por IR na pata;
- Grupo 10 – Somente exercício de natação antes e depois (NAD): 15 camundongos submetidos a natação realizada ao mesmo tempo em que o grupo 6 sem lesão por IR na pata.

Os animais também foram submetidos às análises bioquímicas.

Três grupos de animais foram submetidos à natação e IR: um somente antes da IR, um somente depois da IR e o terceiro começou antes da IR e continuou após. Os demais foram utilizados como controle da lesão, do ambiente aquático ou da natação. No primeiro dia cada grupo exercitado foi submetido a duas sessões de natação com duração de 30 segundos cada, intervaladas por 120 minutos de repouso. No segundo dia, foram realizadas mais duas sessões de dois minutos de duração com repouso de 120 minutos. No terceiro dia realizaram-se três sessões de natação com duração de 10 minutos, intervaladas por um período de cinco minutos de repouso. No quarto dia os animais foram submetidos a duas sessões de 15 minutos, intervaladas por cinco minutos de repouso. A partir do quinto dia até o sétimo dia de exercício, os animais nadaram por 30 minutos contínuos (sem repouso) (tabela 3).

Tabela 3 – Protocolo de natação

Dias	Duração (min) *	Repouso (min)	Nº de sessões	Exercício (min)
1	½	120	2	1
2	2	120	2	4
3	10	5	3	30
4	15	5	2	30
5	30	0	1	30
6	30	0	1	30
7	30	0	1	30

FONTE: Mazzardo-Martins et al., 2010.

NOTAS: * Equivalente ao tempo de duração do exercício em cada sessão. Dias 1 e 2: adaptação.

O grupo IRN passou pela adaptação ao ambiente aquático (dias 1 e 2 da tabela 2) antes da lesão, realizando o exercício no primeiro dia após IR. O grupo NIRN realizou os dois programas: antes da lesão e novamente do dia 3 ao 7 da tabela 2 após a mesma, uma vez que os dias 1 e 2 são de adaptação, conforme representado na figura 15.

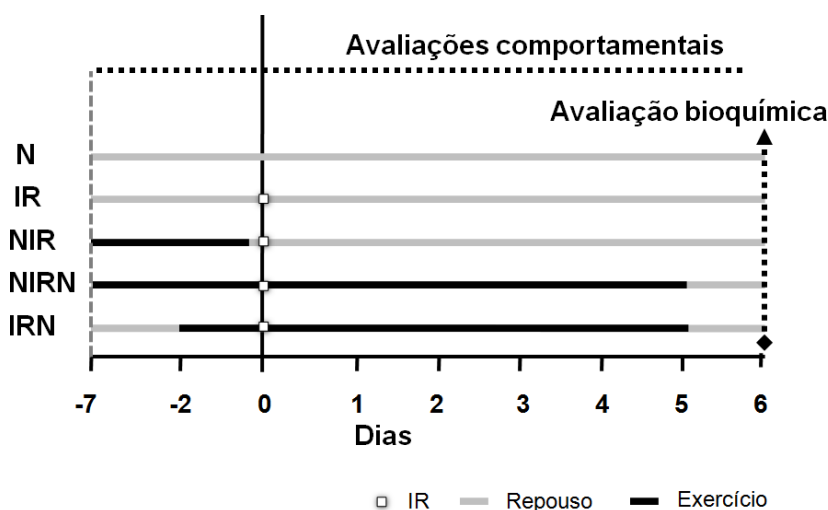


Figura 15 – Esquema dos tempos do exercício e das análises comportamentais e bioquímicas do modelo de síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos.

Todos os grupos foram avaliados antes do início dos programas e no segundo e sétimo dia de exercício antes da IR. No primeiro dia após IR, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais 0, 1, 2, 4 e 24 horas após o exercício. Definiu-se que o melhor tempo para a avaliação foi 24 horas após a última sessão de exercício (para excluir o estresse causado pelo ambiente aquático) e, do segundo ao sexto dia após IR, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais (figura 15). Para realizar as avaliações bioquímicas os animais foram sacrificados no sexto dia após IR, 24 horas após a última sessão de natação.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para análise dos dados comportamentais como: edema, temperatura da pata e hipersensibilidade (mecânica e térmica) sendo empregada a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações. Para análise estatística dos grupos experimentais dos parâmetros bioquímicos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman Keuls. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o software Graph Pad Prism for Windows versão 5.01 (2007).

5 RESULTADOS

O modelo de SDCR tipo I foi realizado através do torniquete do tornozelo que induziu isquemia na pata, a qual apresentou sinais claros de hipóxia. Após três horas, o elástico que mantinha o torniquete no tornozelo foi cortado, permitindo a reperfusão da pata.

A Figura 16 mostra a pata do camundongo antes, durante e após a isquemia. Assim, antes da isquemia (figura 16 A) é possível visualizar o aspecto normal da pata do camundongo; durante a isquemia (figura 16 B), com o torniquete produzido pelo anel elástico posicionado no tornozelo há 2,5 horas, observa-se uma clara evidência de hipóxia pela cianose; após cinco minutos de reperfusão (figura 16 C), a pata já se apresenta ingurgitada pelo sangue, se mostrando edemaciada e com rubor, e permanecendo com este mesmo aspecto por 24 horas; quatro dias após a reperfusão (figura 16 D), pode-se observar que houve diminuição do edema e do rubor e que a pele da pata desenvolveu aspecto ressecado.



Figura 16 – Imagens representativas da pata de camundongos antes, durante e após a isquemia.

A: antes da exposição ao torniquete; B: durante a isquemia, quando a pata se apresenta cianótica e fria, mostrando hipóxia tecidual; C: cinco minutos após a isquemia a pata se mostra ingurgitada com sangue e edematosa, refletindo uma hiperemia reativa intensa; D: quatro dias após a reperfusão, a hiperemia e o edema ainda estão presentes, mas a pele da pata parece ressecada.

5.1 HISTOLOGIA DO NERVO TIBIAL

O nervo tibial do camundongo foi removido seis dias após a IR para análise histológica em microscópio óptico. Os dados apresentados na figura 17 A e B mostram que não houve evidência de degeneração significativa no nervo tibial de nenhum dos camundongos examinados seis dias após IR. Além disso, pode-se observar que não ocorreu alteração significativa no número de axônios mielinizados entre os animais controle (N) e IR (figura 17 C). Com a verificação da ausência de lesão nervosa, pode-se considerar o torniquete do tornozelo como modelo experimental de SDCR tipo I e não tipo II.

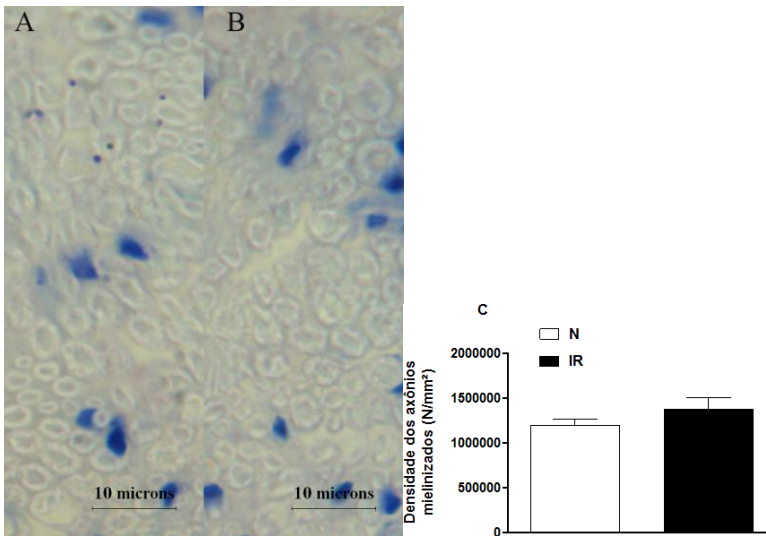


Figura 17 – Imagens representativas da morfologia (painéis A e B) e densidade de axônios mielinizados (painel C) do nervo tibial de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

As imagens foram adquiridas usando-se câmera digital de microscopia conectada a um microscópio de luz. Os resultados apresentados no painel A demonstram a imagem do nervo tibial de camundongo submetido a IR com aumento de 1000 x; o painel B mostra a imagem do nervo tibial de camundongo naive; o painel C mostra que a densidade de fibras mielinizadas não alterou de forma significativa entre animais IR e N seis dias após a reperusão (N: naive; IR: isquemia e reperusão da pata; os dados apresentados representam a média \pm EPM de cinco camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por teste t).

5.2 EFEITOS DA IR NO EDEMA E NA HIPEREMIA DA PATA

Os sinais induzidos pela IR da pata foram investigados. Inicialmente, avaliou-se o edema através da diferença de espessura e a hiperemia através da diferença de temperatura entre as patas. Os resultados apresentados na figura 19 A demonstram que a diferença de espessura entre a pata ipsilateral e contralateral foi significativamente aumentada em camundongos submetidos a IR, quando comparada tanto ao grupo falso-operado (FO) quanto ao naïve (N), entre uma hora ($p < 0,001$) e seis dias ($p < 0,05$) após a reperfusão. Do sétimo dia à sexta semana após IR, não foi observada diferença significativa entre os grupos.

A análise da área sob a curva (figura 18 B) demonstrou aumento na diferença de espessura das patas (edema) no grupo IR comparado aos grupos N e FO ($p < 0,001$).

A hiperemia (diferença de temperatura) entre as patas ipsi e contralateral dos camundongos é mostrada na figura 19 A. Nos grupos N e FO, esta diferença manteve-se inalterada durante as seis semanas de avaliação. Já nos camundongos IR, esta diferença se mostrou elevada entre cinco minutos ($p < 0,001$) e oito horas após a reperfusão ($p < 0,01$), apresentando um pico no dia 4 ($p < 0,05$), retornando aos níveis basais no sétimo dia e assim permanecendo até a sexta semana após IR. Em pacientes, uma diferença de temperatura de $1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou maior entre os lados é considerada anormal (UEMATSU et al., 1988).

A análise da área sob a curva (figura 19 B) diferença maior na temperatura das patas (hiperemia) do grupo IR quando comparado aos grupos N e FO ($p < 0,001$).

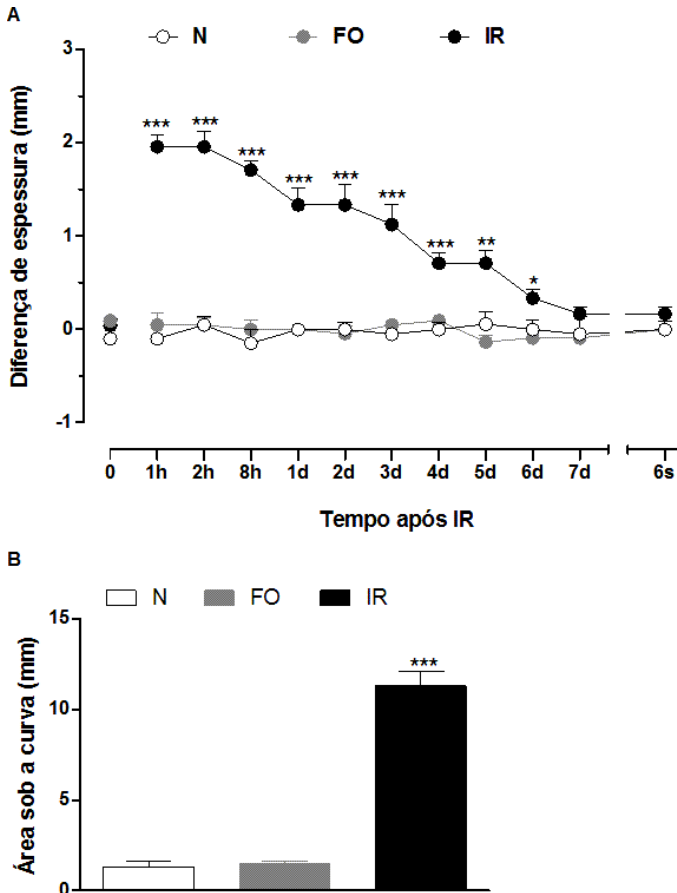


Figura 18 – Edema da pata induzido pela IR em camundongos.

A espessura foi medida com paquímetro universal e a diferença da medida das patas foi utilizada como representativa do edema. Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal do edema – um aumento significativo da espessura da pata foi observado nos camundongos IR entre uma hora e seis dias após a reperusão, mas não nos naive ou falso-operado; os resultados do painel B demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naive; FO: falso-operado; IR: isquemia e reperusão da pata; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA da uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla (para ASC). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao grupo FO).

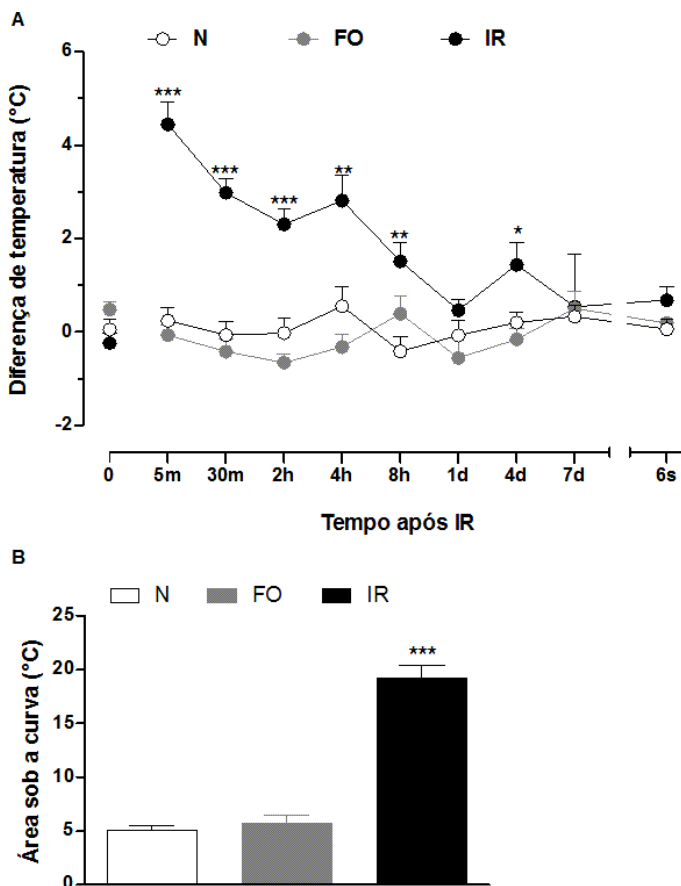


Figura 19 – Hiperemia da pata induzida pela IR em camundongos.

Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal da hiperemia – um aumento significativo da temperatura foi observado nos camundongos IR, mas não nos N ou FO, entre cinco minutos e oito horas após IR, com um pico no dia 4 e posterior permanência nos níveis basais; os resultados do painel B demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naive; FO: falso-operado; IR: isquemia e reperfusão da pata; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao FO).

5.3 EFEITOS DA IR SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA E TÉRMICA (AO FRIO) DA PATA

Após a pesquisa do edema e da hiperemia da pata, foram caracterizados os efeitos da IR sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica (ao frio). A IR resultou em diminuição do limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico (aumento da hipersensibilidade mecânica) e diminuição da latência de retirada da pata sob o estímulo frio de 10 °C (aumento da hipersensibilidade térmica ao frio) por um período prolongado após a lesão (Figuras 20 A, B e 21 A, B).

Na figura 20 A é possível observar que os camundongos submetidos a IR desenvolveram hipersensibilidade mecânica no primeiro dia após a IR ($p < 0,05$), sendo observado um pico no dia 4 ($p < 0,001$), e persistindo por quatro semanas após a reperusão ($p < 0,001$).

A análise da área sob a curva (figura 20 B) demonstrou redução do limiar de retirada no grupo IR comparado aos grupos N e FO, apontando para aumento da hipersensibilidade mecânica ($p < 0,001$).

A figura 21 A demonstra a semelhança de valores de latência de retirada da pata ao estímulo frio (10°C) nos camundongos N e FO durante as seis semanas de teste. Entretanto, camundongos IR desenvolveram hipersensibilidade térmica ao frio um dia após a reperusão ($p < 0,001$). Da mesma forma que na hipersensibilidade mecânica, houve um pico no quarto dia ($p < 0,001$) e a hipersensibilidade ao frio persistiu por quatro semanas após a reperusão ($p < 0,001$).

A análise da área sob a curva (figura 21 B) demonstrou redução da latência de retirada no grupo IR comparado aos grupos N e FO, sugerindo aumento da hipersensibilidade térmica ao frio ($p < 0,001$).

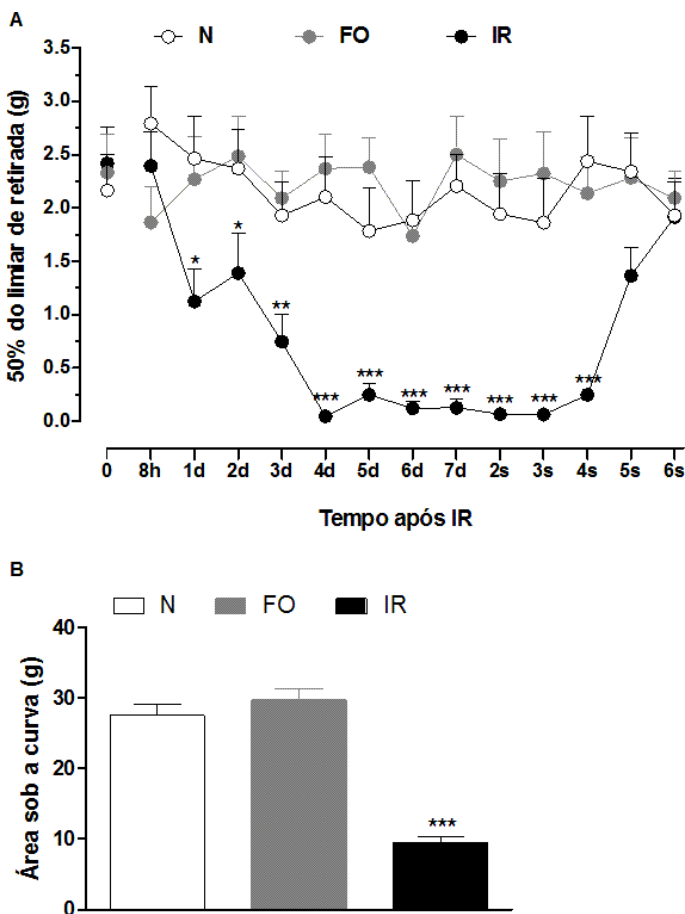


Figura 20 – Hipersensibilidade mecânica na pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal da hipersensibilidade mecânica – aumento significativo no limiar de retirada da pata foi observado nos camundongos IR entre um dia e quatro semanas após a reperfusão, mas não nos N ou FO; Os resultados do painel B demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naive; FO: falso-operado; IR: isquemia e reperfusão da pata; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao FO).

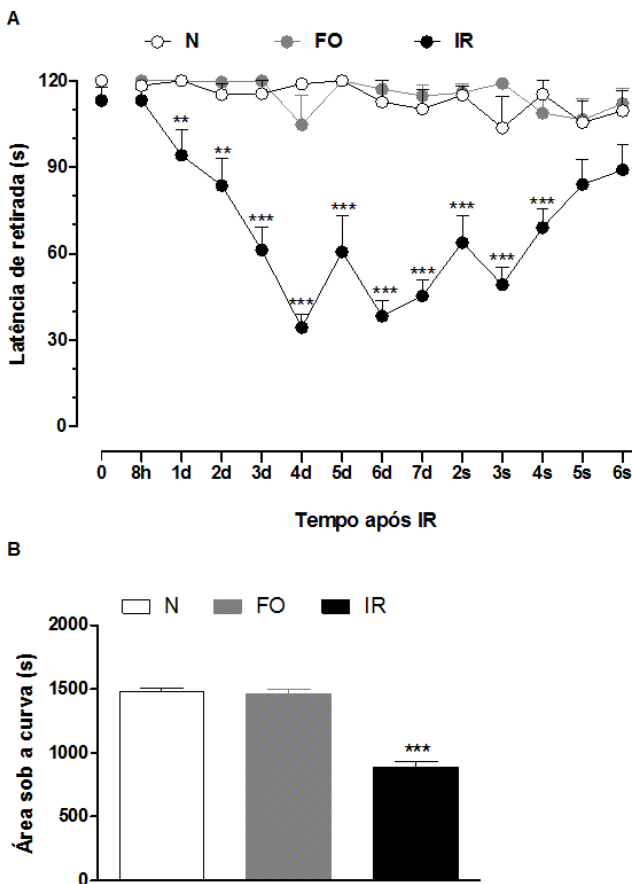


Figura 21 – Hipersensibilidade térmica ao frio (10°C) na pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal da hipersensibilidade ao frio – os camundongos N e FO não apresentaram alteração na latência de retirada da pata. Entretanto, foi observado aumento significativo nos camundongos IR entre um dia e quatro semanas após a reperusão; o painel B Área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naive; FO: falso-operado; IR: isquemia e reperusão da pata; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA da uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao FO).

5.4 EFEITOS DA IR SOBRE OS NÍVEIS DE IL-1 β , IL-6, IL-10 E TNF- α NA MEDULA ESPINAL E NA PELE DA PATA DE CAMUNDONGOS

A caracterização bioquímica com a investigação do caráter inflamatório na manutenção da lesão por IR foi analisada. A medula espinal e a pele da pata dos grupos de animais foram coletadas para análise de citocinas no sexto dia após a IR. Todavia, não foram encontradas evidências de que a inflamação participe da manutenção da DPIC. Os dados apresentados nas figuras 22 A-D e 23 A-D demonstram níveis equivalentes de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , entre os animais IR e naive, tanto na pele da pata quanto na medula espinal.

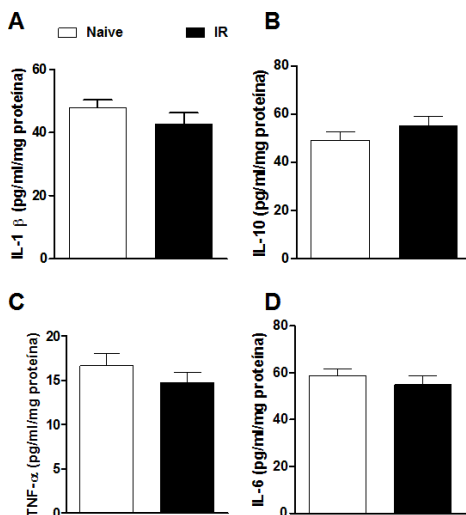


Figura 22 – Níveis de citocinas (interleucina-1 β , interleucina-6, interleucina-10 e fator de necrose tumoral- α) na pele da pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Seis dias após IR, a pele da pata foi removida dos animais para a análise. Observou-se que os níveis de citocinas não diferem entre os grupos IR e N (N: naive; IR: isquemia e reperfusão da pata); os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por teste t.

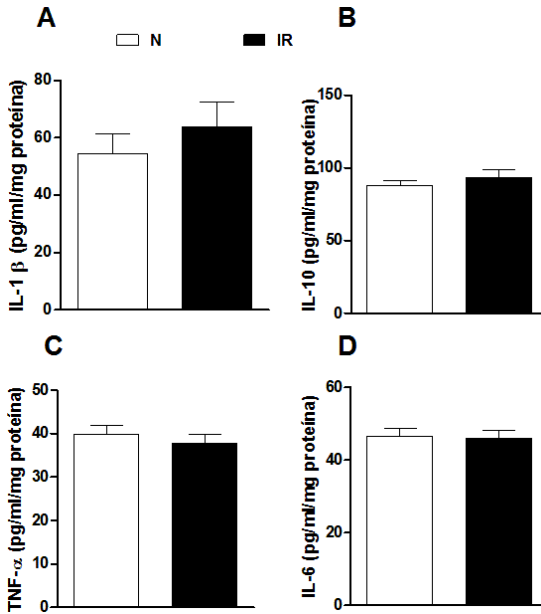


Figura 23 – Níveis de citocinas (interleucina-1 β , interleucina-6, interleucina-10 e fator de necrose tumoral- α) na medula espinal de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Seis dias após IR, a medula espinal foi removida dos animais para a análise. Observou-se que os níveis de citocinas não diferem entre os grupos IR e N (N: naive; IR: isquemia e reperfusão da pata; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por teste t.

5.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TIÓIS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR

A caracterização bioquímica seguiu através da investigação do envolvimento do estresse oxidativo na manutenção da lesão por IR. A medula espinal e a pele da pata dos grupos de animais foram coletadas para análise de tióis totais, proteicos e não proteicos no sexto dia após a IR. Os resultados sugerem que o estresse oxidativo atua na manutenção da DPIC.

Na figura 24, observa-se que seis dias após IR, os camundongos apresentaram níveis elevados de tióis totais, proteicos e não proteicos (descritos em nM SH/mg proteína), tanto na medula espinal quanto na pele da pata, quando comparados aos animais naive ($p < 0,001$).

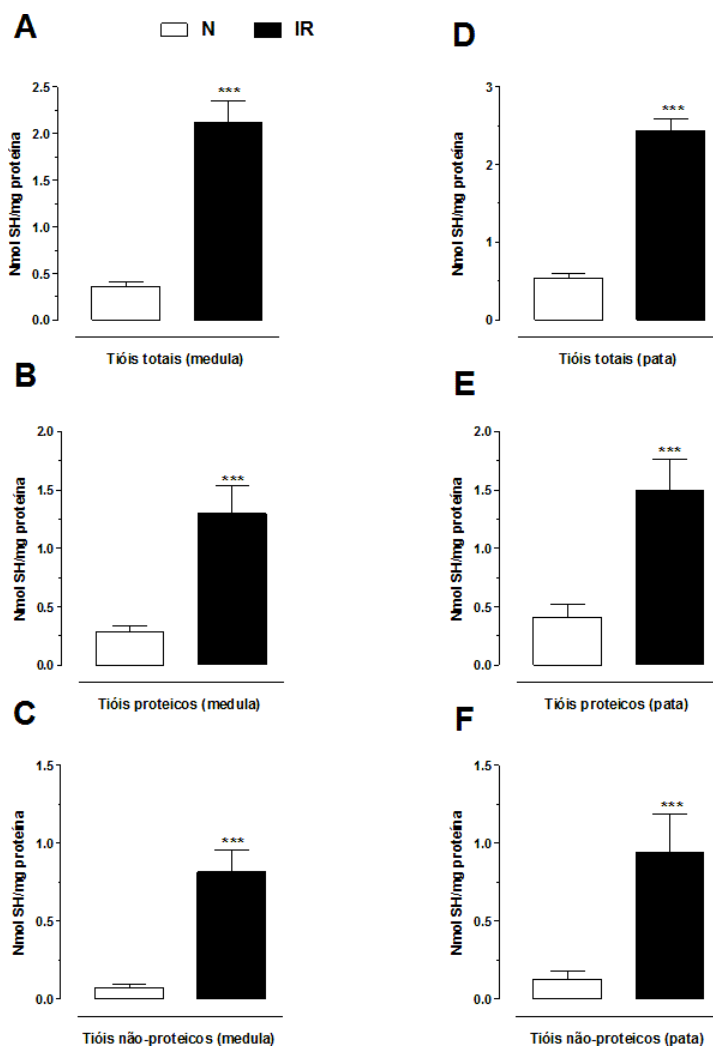


Figura 24 – Níveis de tióis na pele da pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Seis dias após IR, a pele da pata foi removida dos animais para a análise. Observou-se que os níveis de tióis do grupo IR encontram-se elevados quando comparados ao grupo N (N: naïve; IR: isquemia e reperfusão da pata; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por teste t.

5.6 EFEITOS DO ANTIOXIDANTE (NAC) SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR

Considerando a possibilidade do envolvimento do estresse oxidativo na manutenção da DPIC, investigou-se o efeito antinociceptivo do antioxidante NAC em camundongos submetidos a IR, na sua fase aguda (dois dias após IR) e crônica (sete dias após IR). O resultado encontrado reforça a possibilidade do envolvimento do estresse oxidativo tanto na indução quanto na manutenção da DPIC.

É possível observar que o NAC diminuiu a hipersensibilidade mecânica tanto no dia 2 (figura 25 A) quanto no dia 7 após a reperusão (figura 25 B). Inicialmente, os camundongos apresentaram um limiar de retirada significativamente menor que os níveis basais ($p < 0,001$), sugerindo que eles apresentavam hipersensibilidade prévia ao tratamento. O limiar de retirada foi significativamente maior do que os dos camundongos tratados apenas com veículo trinta minutos após o tratamento com NAC ($p < 0,001$), chegando próximo aos níveis basais. Estes dados demonstram que o antioxidante NAC diminuiu a hipersensibilidade mecânica causada por IR por pelo menos duas horas.

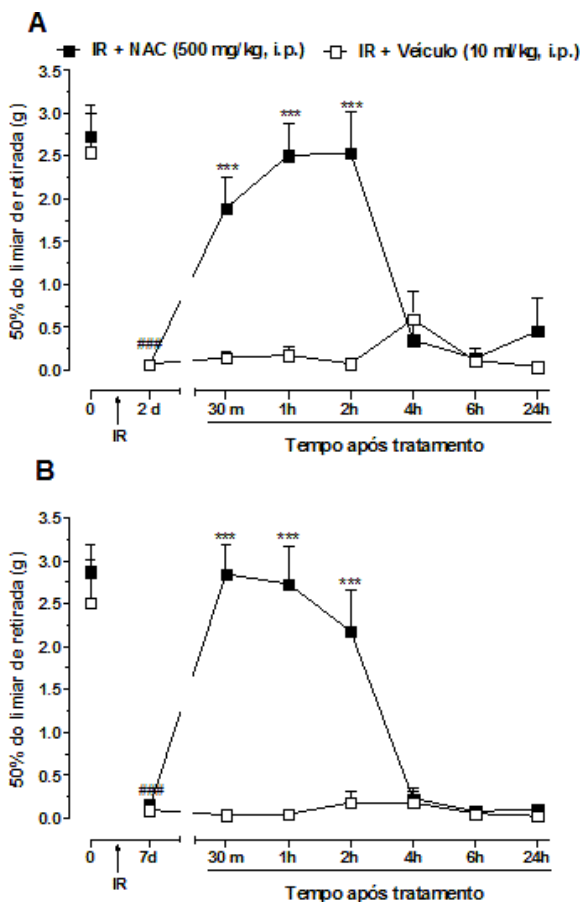


Figura 25 – Efeito do tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC) sobre a hipersensibilidade mecânica da pata em camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

O tratamento com NAC (500 mg/kg, i.p.) reduziu a hipersensibilidade mecânica 30 minutos após o tratamento com NAC e este efeito perdurou por até duas horas quando comparado ao veículo (10ml/kg, i.p.) dois (painel A) e sete dias (painel B) após a reperfusão (IR+NAC: isquemia e reperfusão da pata tratada sistemicamente com NAC; IR + Veículo: isquemia e reperfusão da pata tratada sistemicamente com veículo; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. ### $p < 0,001$ comparado ao seu respectivo basal; *** $p < 0,001$ comparado ao veículo).

5.7 EFEITOS DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR

Da mesma forma, investigou-se o efeito antinociceptivo de fármacos utilizados clinicamente no tratamento da DPIC em camundongos submetidos a IR, tanto em sua fase aguda (dois dias após IR) quanto crônica (sete dias após IR). Primeiramente, analisou-se o efeito dos fármacos anti-inflamatórios na DPIC e os resultados encontrados foram semelhantes ao que ocorre na prática clínica. Na figura 26, tanto no dia 2 quanto no dia 7 após a reperfusão, os camundongos apresentaram limiar de retirada significativamente menor que os níveis basais ($p < 0,001$). Os fármacos anti-inflamatórios (ibuprofeno e dexametasona) aumentaram de forma significativa o limiar de retirada da pata no segundo dia após IR (figura 26 A). O ibuprofeno apresentou efeito antinociceptivo entre 30 ($p < 0,001$) e 90 minutos ($p < 0,05$) e a dexametasona apresentou efeito entre 30 ($p < 0,01$) e 45 minutos ($p < 0,001$) após o tratamento. Entretanto, sete dias após a reperfusão, não houve diferença entre os grupos submetidos a IR que foram tratados com ibuprofeno ou dexametasona quando comparados ao grupo que não recebeu tratamento (figura 26 B).

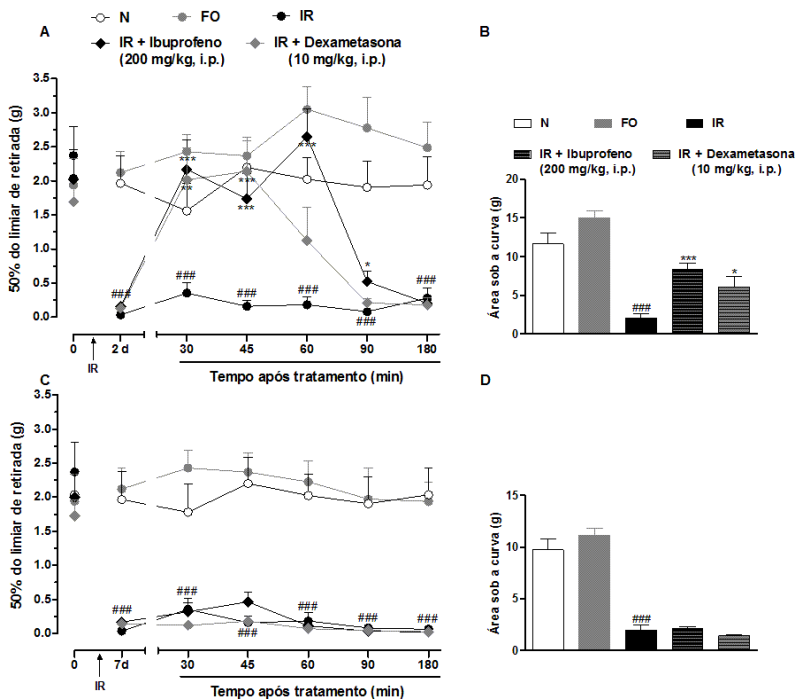


Figura 26 – Efeitos do tratamento com ibuprofeno e dexametasona sobre a hipersensibilidade mecânica em camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Dois dias após IR (painel A), o tratamento de animais com ibuprofeno (200 mg/kg, i.p.) reduziu a hipersensibilidade mecânica entre 30 e 90 minutos após o tratamento. Além disso, o tratamento com dexametasona (10 mg/kg, i.p.) reduziu a hipersensibilidade mecânica entre 30 e 45 minutos após o tratamento. Sete dias após IR (painel C), os fármacos antiinflamatórios não apresentaram nenhum efeito sobre a hipersensibilidade mecânica. Os resultados do painel B e D demonstram a área sob a curva correspondente aos gráficos A e C respectivamente, com diminuição da hipersensibilidade mecânica pelos antiinflamatórios apenas dois dias após IR (N: naive; FO: falso-operado; IR: isquemia e reperusão da pata; IR + Ibuprofeno: isquemia e reperusão da pata tratada sistemicamente com ibuprofeno; IR + Dexametasona: isquemia e reperusão da pata tratada sistemicamente com dexametasona; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA da uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao IR e #### $p < 0,001$ comparados ao N).

5.8 EFEITOS DE FÁRMACOS ANTI-NEUROPÁTICOS SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR

O efeito de medicamentos utilizados para o tratamento da dor neuropática foi analisado. Os fármacos anti-neuropáticos utilizados foram capazes de reduzir tanto a hipersensibilidade mecânica aguda (segundo dia após IR) quanto a crônica (sétimo dia após IR). Conforme demonstrado na figura 27 A, no dia 2 o limiar de retirada da pata dos camundongos IR que receberam tratamento com morfina e gabapentina foi significativamente maior que o limiar dos que não receberam tratamento entre 30 e 45 minutos ($p < 0,001$) após a administração, sendo que o pico de redução da hipersensibilidade mecânica foi aos 90 minutos após tratamento. No dia 7 (figura 27 B), o tratamento com ambos anti-neuropáticos foi capaz de aumentar o limiar de retirada (diminuir a hipersensibilidade) dos camundongos submetidos a IR 30 (morfina: $p < 0,05$ e gabapentina: $p < 0,001$) e 45 minutos (morfina e gabapentina: $p < 0,01$) após o tratamento. Aos 90 minutos após o tratamento, apenas a gabapentina foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,01$) a hipersensibilidade mecânica induzida por IR.

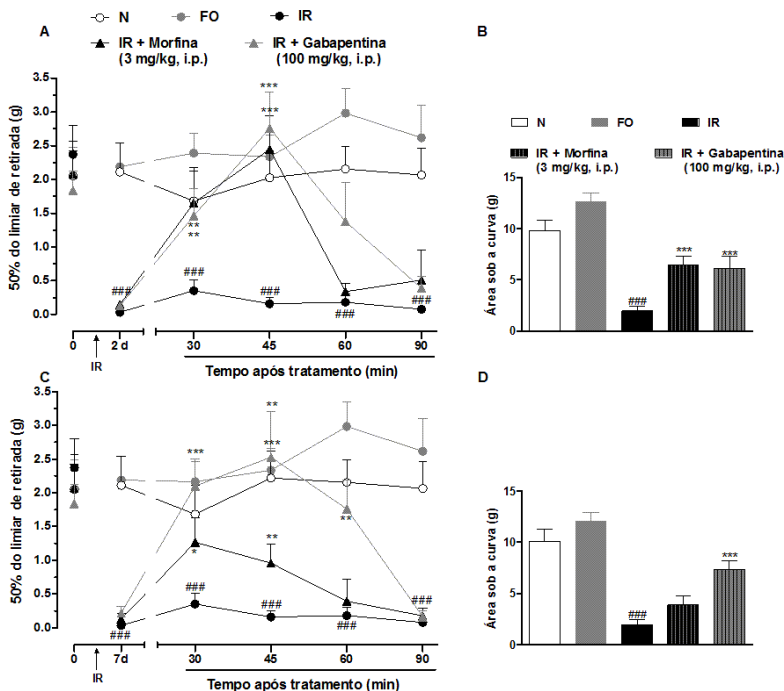


Figura 27 – Efeitos do tratamento com morfina e gabapentina sobre a hipersensibilidade mecânica da pata em camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Dois dias após IR (painel A), o tratamento com morfina (3 mg/kg, i.p.) e gabapentina (100 mg/kg, i.p.) reduziram a hipersensibilidade mecânica 30 e 45 minutos após sua administração. Sete dias após IR (painel C), morfina e gabapentina reduziram a hipersensibilidade mecânica 30, 45 e 90 minutos e 30 e 45 minutos após o tratamento, respectivamente. Os resultados do painel B e D demonstram a área sob a curva correspondente aos gráficos A e C respectivamente, com diminuição da hipersensibilidade mecânica pelos dois antineuropáticos dois dias após IR e apenas pela morfina sete dias após IR (N: naïve; FO: falso-operado; IR: isquemia e reperfusão da pata; IR + Morfina: isquemia e reperfusão da pata tratada sistemicamente com morfina; IR + Gabapentina: isquemia e reperfusão da pata tratada sistemicamente com gabapentina; os dados apresentados representam a descritos como média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA da uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao IR e #### $p < 0,001$ comparados ao N).

5.9 EFEITOS DA NATAÇÃO SOBRE O EDEMA E A HIPEREMIA DA PATA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR

Depois de realizar a caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica do modelo da DPIC, foram observados os efeitos do exercício de natação sobre as características comportamentais e bioquímicas encontradas. Os animais foram submetidos a IR e os grupos que nadaram foram comparados aos que não nadaram. A maior parte dos efeitos encontrados sobre as características analisadas sugerem o benefício do exercício físico. Além disso, foram observadas as mesmas características em grupos utilizados como controle, a fim de verificar o efeito do exercício *per se* (grupos que realizaram exercício sem IR: NA, NAD e ND) e o efeito do ambiente aquático sobre a IR (grupo que permaneceu em água rasa: IRRaso). De um modo geral, os grupos utilizados como controle apresentaram comportamento similar aos grupos naive (para os animais NA, NAD e ND) ou IR (para os animais IRRaso). Desta forma, inicialmente investigou-se o efeito da natação sobre o edema e a hiperemia da pata, sendo que ocorreu diminuição do edema nos animais IRN, mas aumento da hiperemia pelo exercício. Entretanto, observou-se que este aumento da hiperemia pode ser devido ao ambiente aquático.

Assim, observa-se na figura 28 A que o grupo IR apresentou um aumento significativo na diferença de espessura entre as patas quando comparado aos níveis basais até o terceiro dia após a lesão isquêmica. Pode-se observar também, que os animais NIR apresentaram um perfil um pouco alterado quando comparados ao grupo IR: cinco minutos após a lesão, não houve diferença entre IR e NIR; além disso, o grupo NIR apresentou aumento ($p < 0,001$) no primeiro dia e diminuição na diferença de espessura no quarto dia após a lesão ($p < 0,05$), respectivamente, em relação ao grupo IR; nos demais dias observados, os animais apresentaram o mesmo perfil dos animais IR. Estes dados demonstram que o grupo submetido ao protocolo de natação somente antes da lesão isquêmica apresentou, inicialmente, um aumento no edema da pata. No quarto dia, entretanto, observou-se diminuição deste edema (Figura 28 A). Os animais NIRN também apresentaram diminuição na diferença de espessura das patas com relação grupo IR no quarto dia após a lesão ($p < 0,05$). Nos demais dias observados, os animais NIRN apresentaram o mesmo perfil dos animais IR (Figura 28 A).

Os animais IRN apresentaram diminuição na diferença de espessura quando comparados ao grupo IR cinco minutos ($p < 0,001$) e

quatro dias após a lesão ($p < 0,05$). Nos demais tempos observados, não houve diferença entre IR e IRN (Figura 28 A). O grupo IRRaso apresentou uma diminuição do edema ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo IR antes do primeiro contato com a água após a lesão. Observou-se ainda uma diminuição do edema nos dias 2 ($p < 0,05$) e 4 ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo IR (Figura 28 A).

A análise da área sob a curva (figura 28 B) demonstrou que entre os grupos que realizaram exercício, somente o grupo IRN apresentou diferença de espessura entre as patas menor que o grupo IR, resultando na diminuição do edema ($p < 0,001$). Além disso, o grupo IRRaso apresentou aumento do edema quando comparado ao grupo IR ($p < 0,05$).

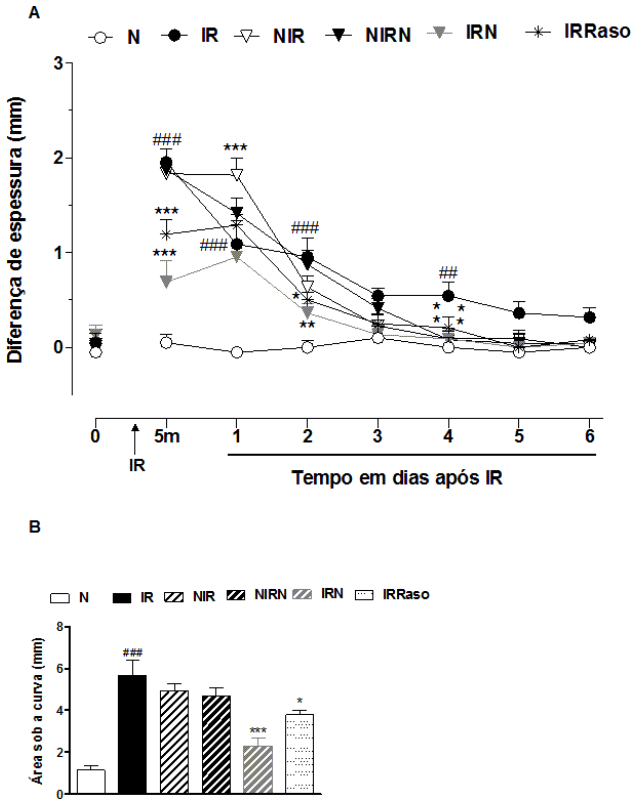


Figura 28 – Efeito da natação sobre o edema da pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal do edema com diversas avaliações: 0 – anterior a IR, 5m – cinco minutos após a reperusão e de 1 a 6 – um a seis dias após a lesão, sempre 24 horas após a última sessão de natação dos grupos exercitados; os resultados do painel B demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naive; IR: isquemia e reperusão da pata; NIR: protocolo de natação realizado antes da IR; NIRN: protocolo de natação realizado antes e após a IR; IRN: protocolo de natação realizado somente após a IR; IRRaso: exposição ao ambiente aquático sem realização de exercício; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA da uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao IR e ### $p < 0,001$ comparados ao N).

Na figura 29 A é possível visualizar que o grupo IR apresentou aumento significativo na diferença de temperatura entre as patas somente cinco minutos após a lesão. Pode-se observar também, que os animais NIR e NIRN apresentaram perfil um pouco alterado quando comparados ao grupo IR (Figura 29 A).

De fato, pode se observar no grupo NIR que, cinco minutos após a lesão, não houve diferença em relação ao IR. Contudo, um a quatro dias após a lesão apresentou um aumento na diferença de temperatura em relação ao grupo IR; sendo que nos outros dias observados, os animais apresentam o mesmo perfil dos animais IR; em outras palavras, inicialmente há um aumento na hiperemia da pata que diminui no dia 5 (Figura 29 A). O grupo NIRN não apresentou mudanças na temperatura das patas cinco minutos e um dia após a lesão em relação ao grupo IR e NIRN. Contudo, dois a quatro dias após a lesão, foi observado um aumento na diferença da temperatura em relação ao grupo IR; nos demais dias observados, os animais apresentam o mesmo perfil dos animais IR (Figura 29 A). Por outro lado, os animais IRN não apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo IR (Figura 29 A). Por fim, o grupo IRRaso apresentou no dia 4 um aumento da hiperemia ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo IR. Nas demais avaliações não houve diferença estatística quando comparados ao grupo IR (Figura 29 A).

A análise da área sob a curva (figura 29 B) demonstrou que os grupos exercitados apresentaram diferença de temperatura entre as patas maior que o grupo IR, o que significa aumento da hiperemia ($p < 0,001$ para os grupos NIR, NIRN e IRN). Da mesma forma, os animais do grupo IRRaso apresentaram aumento da hiperemia ($p < 0,001$), sugerindo que o aumento da hiperemia seja devido ao ambiente aquático.

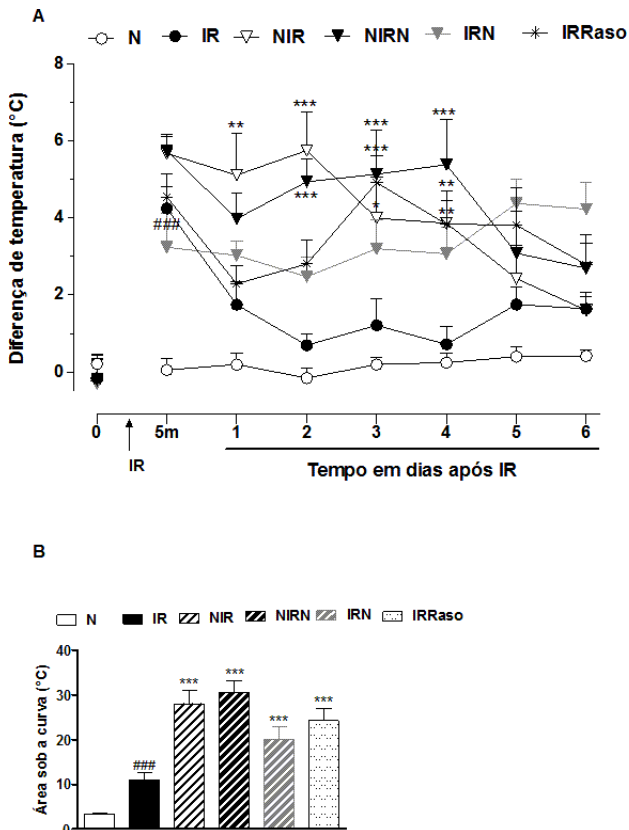


Figura 29 – Efeito da natação sobre a hiperemia da pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal da hiperemia com diversas avaliações: 0 – anterior a IR, 5m – cinco minutos após a reperfusão e de 1 a 6 – um a seis dias após a lesão, sempre 24 horas após a última sessão de natação dos grupos exercitados; os resultados do painel B demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naive; IR: isquemia e reperfusão da pata; NIR: protocolo de natação realizado antes da IR; NIRN: protocolo de natação realizado antes e após a IR; IRN: protocolo de natação realizado somente após a IR; IRRaso: exposição ao ambiente aquático sem realização de exercício; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao IR e ### $p < 0,001$ comparados ao N).

5.10 EFEITOS DA NATAÇÃO SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR

Em seguida, foram investigados os efeitos da natação sobre a hipersensibilidade mecânica induzida por IR. Observou-se diminuição significativa da hipersensibilidade mecânica, o que sugere que o exercício de natação pode ser um meio de tratamento eficaz para a dor evocada por estímulo mecânico em pacientes com SDCR tipo I.

Os resultados apresentados na figura 30 A demonstram o decurso temporal da diminuição da hipersensibilidade mecânica induzida pela natação, após uma sessão de exercício em camundongos submetidos ao teste Von Frey. Pode-se observar que houve aumento significativo do limiar de retirada da pata entre uma e duas horas após o exercício nos animais IRN. Além disso, os animais NIR e NIRN não desenvolveram hipersensibilidade (Figura 30 A).

A análise da área sob a curva (figura 30 B) demonstrou limiar de retirada elevado em todos os grupos exercitados em relação ao grupo IR, o que significa diminuição da hipersensibilidade mecânica ($p < 0,001$ para os grupos NIR, NIRN e N em relação ao IR e $p < 0,05$ para o grupo IRN em relação ao IR).

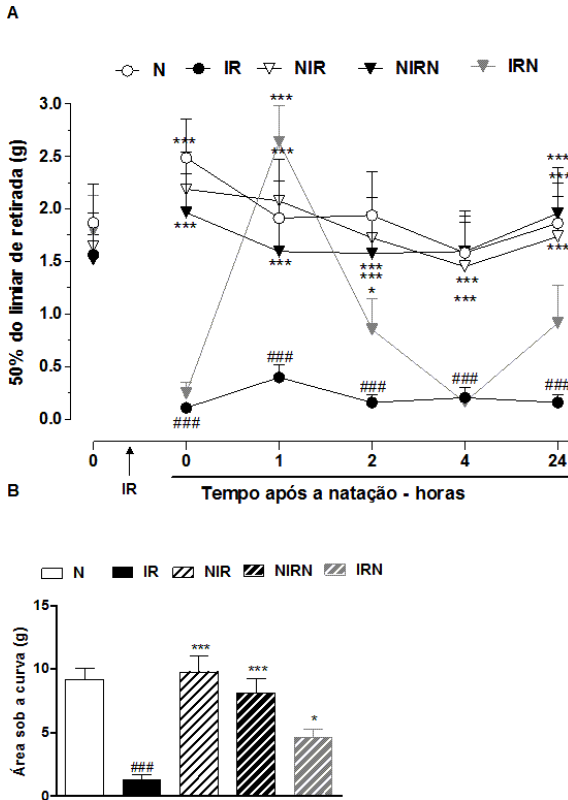


Figura 30 – Efeito da natação sobre a hipersensibilidade mecânica da pata de camundongos no primeiro dia após IR.

Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal da hipersensibilidade mecânica com diversas avaliações: 0 – anterior a IR e um dia após a lesão por IR em diferentes tempos relacionados a realização do exercício físico – pré (0) e 1, 2, 4 e 24 horas após a sessão de natação dos grupos exercitados; os resultados do painel B demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naive; IR: isquemia e reperusão da pata; NIR: protocolo de natação realizado antes da IR; NIRN: protocolo de natação realizado antes e após a IR; IRN: protocolo de natação realizado somente após a IR; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA da uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao IR e ### $p < 0,001$ comparados ao N).

A partir deste experimento, o tempo escolhido para realização dos demais experimentos foi 24 horas após cada sessão de natação. Assim, pode-se observar na figura 31 A que o grupo IR apresentou diminuição significativa no limiar sensorial mecânico quando comparados aos níveis basais. Além disso, os animais NIR apresentaram um aumento no limiar de retirada quando comparados ao grupo IR. Este aumento no limiar persistiu até o dia 5 após a indução da lesão, demonstrando um atraso no desenvolvimento da hipersensibilidade induzida pela lesão até o dia 6 após a reperusão e o possível efeito profilático do exercício de natação sobre a DPIC (Figura 31 A).

Os animais NIRN também apresentaram aumento no limiar de retirada quando comparados ao grupo IR, mas este aumento persistiu por todo o período de avaliação reforçando o caráter profilático do exercício com relação ao desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica pela isquemia e sugerindo também o efeito terapêutico (Figura 31 A). Por fim, os animais IRN apresentaram aumento no limiar de retirada somente no terceiro dia após a lesão quando comparados ao grupo IR. Este grupo permaneceu com diminuição da hipersensibilidade mecânica até o fim das avaliações, o que corrobora com a indicação da natação como tratamento da hipersensibilidade mecânica induzida a partir da lesão isquêmica (Figura 31 A).

A análise da área sob a curva (figura 31 B) demonstrou que os grupos exercitados de modo geral apresentaram limiar de retirada maior que o grupo IR, o que significa diminuição da hipersensibilidade mecânica ($p < 0,001$).

Já, os grupos que nadaram sem ter sofrido lesão por IR (NA, ND e NAD) não apresentaram diferença significativa do limiar de retirada da pata quando comparados ao grupo naive e o grupo que permaneceu na água rasa (IRRaso) não apresentou diferença significativa no limiar de retirada quando comparados ao grupo IR (dados não apresentados).

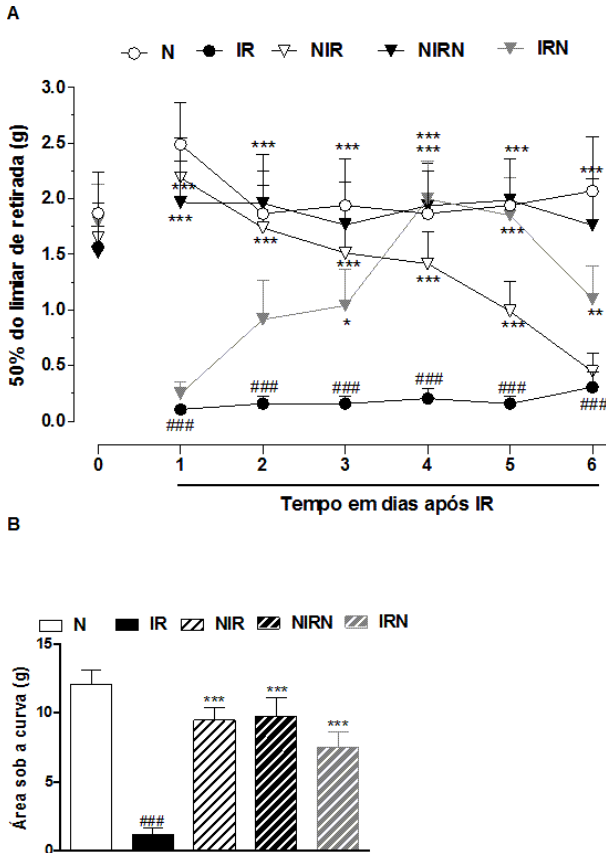


Figura 31 – Efeito da natação sobre a hipersensibilidade mecânica da pata de camundongos induzida por IR.

Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal da hiperemia com diversas avaliações: 0 – anterior a IR e 1 a 6 – um a seis dias após a lesão por IR, 24 horas após cada sessão de natação dos grupos exercitados; os resultados do painel B demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naïve; IR: isquemia e reperfusão da pata; NIR: protocolo de natação realizado antes da IR; NIRN: protocolo de natação realizado antes e após a IR; IRN: protocolo de natação realizado somente após a IR; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao IR e ### $p < 0,001$ comparados ao N).

5.11 EFEITOS DA NATAÇÃO SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR

Para concluir a análise dos efeitos do exercício sobre as características comportamentais observadas nos camundongos submetidos a IR, foram investigados os efeitos da natação sobre a hipersensibilidade térmica ao frio de 10 ° C. Observou-se, de modo geral, diminuição significativa da hipersensibilidade ao frio no grupo NIRN (Figura 32 A).

Os resultados apresentados na figura 32 A demonstram o decurso temporal da diminuição da hipersensibilidade térmica ao frio induzida pela natação, após uma sessão de exercício em camundongos submetidos ao teste da placa fria. Observa-se que houve aumento significativo da latência de retirada dos animais NIR e NIRN até uma e duas horas respectivamente após a sessão de natação. Por outro lado, não houve diferença significativa entre a latência de retirada dos animais IRN e dos IR (Figura 32 A).

O grupo IRRaso apresentou, antes do contato com a água, aumento da latência de retirada ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo IR. Após a permanência na água, em 24 horas não foi observada diferença com relação ao grupo IR (dados não mostrados).

A análise da área sob a curva (figura 32 B) demonstrou que o grupo NIRN apresentou latência de retirada maior que o grupo IR, ou seja, diminuição da hipersensibilidade térmica ao frio ($p < 0,05$).

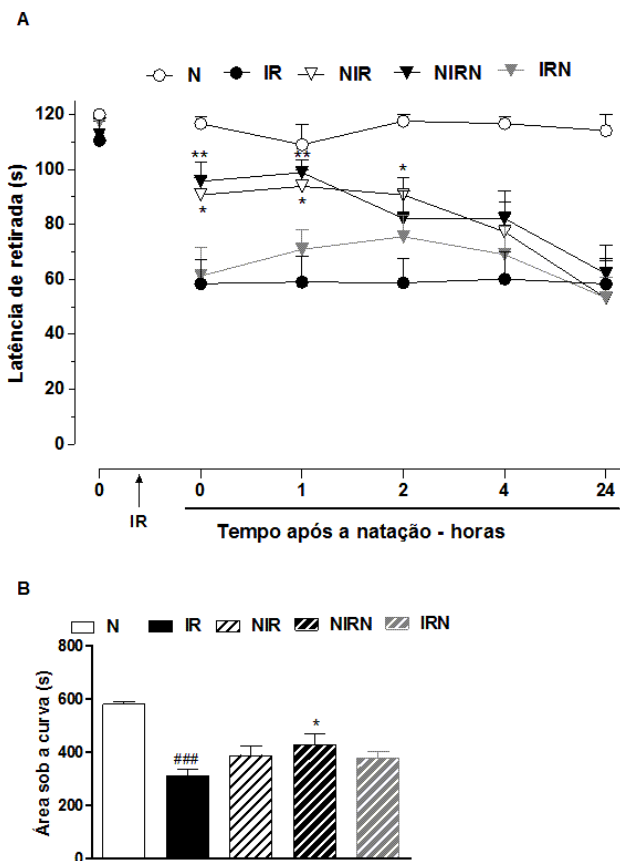


Figura 32– Efeito da natação sobre a hipersensibilidade térmica ao frio (10°C) na pata de camundongos no primeiro dia após IR.

Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal da hipersensibilidade térmica ao frio com diversas avaliações: 0 – anterior a IR em diferentes tempos relacionados a realização do exercício físico – pré (0) e 1, 2, 4 e 24 horas após a sessão de natação dos grupos exercitados; os resultados do painel B demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naïve; IR: isquemia e reperfusão da pata; NIR: protocolo de natação realizado antes da IR; NIRN: protocolo de natação realizado antes e após a IR; IRN: protocolo de natação realizado somente após a IR; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA da uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao IR e ### $p < 0,001$ comparados ao N).

A partir deste experimento, o tempo escolhido para realização dos demais experimentos foi 24 horas após cada sessão de natação. Observa-se na figura 33 A que o grupo IR apresentou uma diminuição significativa na latência de retirada em resposta ao estímulo térmico (frio) quando comparado aos níveis basais, e que os animais do grupo IRRaso apresentaram o mesmo perfil de resposta destes animais. Pode-se observar também, que os animais NIR apresentaram, nos dias 4 e 5, um aumento na latência de retirada quando comparados ao grupo IR. Além disso, os animais NIRN apresentaram, também no dia 4, aumento na latência de retirada quando comparados ao grupo IR, mas este aumento persistiu até o período de avaliação. Por fim, os animais IRN apresentaram um aumento na latência de retirada também no quarto dia após a lesão quando comparados ao grupo IR. Este grupo permaneceu com diminuição da hipersensibilidade térmica ao frio até o fim das avaliações, o que demonstra um caráter de tratamento da hipersensibilidade ao estímulo frio causado lesão isquêmica pela natação (Figura 33 A).

A análise da área sob a curva (figura 33 B) demonstrou que o grupo NIRN apresentou latência de retirada maior que o grupo IR, ou seja, diminuição da hipersensibilidade térmica ao frio ($p < 0,01$).

Os grupos que nadaram sem ter sofrido lesão por IR (NA, ND e NAD) não apresentaram diferença significativa da latência de retirada da pata quando comparados ao grupo naive (dados não apresentados).

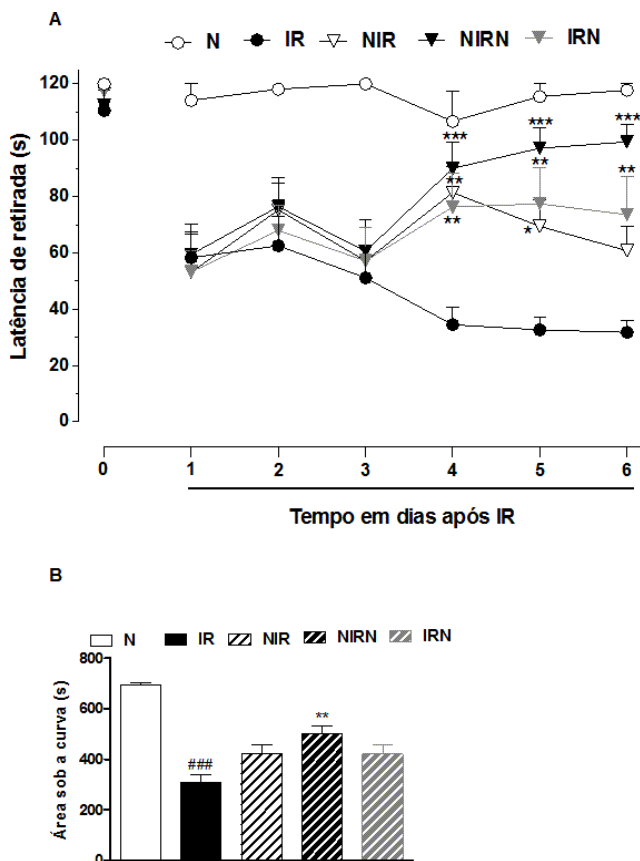


Figura 33 – Efeito da natação sobre a hipersensibilidade térmica ao frio (10°C) na pata de camundongos induzida por IR.

Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal da hiperemia com diversas avaliações: 0 – anterior a IR e 1 a 6 – um a seis dias após a lesão por IR, 24 horas após cada sessão de natação dos grupos exercitados; os resultados do painel B demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (N: naive; IR: isquemia e reperusão da pata; NIR: protocolo de natação realizado antes da IR; NIRN: protocolo de natação realizado antes e após a IR; IRN: protocolo de natação realizado somente após a IR; os dados apresentados representam a média \pm EPM de 15 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ou ANOVA da uma via seguida de Newman-Keuls – teste de comparação múltipla para ASC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparados ao IR e ### $p < 0,001$ comparados ao N).

5.12 EFEITOS DA NATAÇÃO SOBRE OS NÍVEIS DE TIÓIS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A IR

Para analisar dos efeitos do exercício sobre as características bioquímicas, foi investigado o efeito da natação sobre o estresse oxidativo induzido por IR em camundongos através da mensuração dos níveis de tióis. Para isto, a medula espinal e a pele da pata dos grupos de animais foram coletadas para análise de tióis totais, proteicos e não proteicos no sexto dia após a IR, quando todos os grupos haviam realizado o protocolo completo de natação. Os dados obtidos mostram que a natação não alterou os níveis de tióis na pele da pata nem na medula espinal, pois os animais que nadaram sem ser submetidos a IR (NA, NAD e ND) não apresentaram diferença significativa quando comparados aos animais naive. Além disso, os animais que nadaram sendo submetidos a IR (NIR, NIRN e IRN) não apresentaram diferença significativa quando comparados aos animais IR. O grupo que permaneceu em água rasa (IRRaso) também não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo IR (tabela 4).

Tabela 4 – Níveis de tióis na medula espinal e na pele da pata de camundongos com DPIC após natação

	Tióis totais	Tióis proteicos	Tióis não proteicos
<i>Medula Espinal</i>			
Naive	0,36 ± 0,05	0,29 ± 0,05	0,07 ± 0,02
IR	2,12 ± 0,23 ***	1,30 ± 0,23 ***	0,82 ± 0,14 ***
NIR	1,93 ± 0,27	1,06 ± 0,26	0,87 ± 0,84
NIRN	1,97 ± 0,22	0,82 ± 0,18	1,15 ± 0,21
IRN	1,65 ± 0,21	0,53 ± 0,21	1,12 ± 0,13
IRRaso	1,84 ± 0,14	0,82 ± 0,13	1,03 ± 0,10
NA	0,43 ± 0,07	0,34 ± 0,08	0,09 ± 0,04
NAD	0,36 ± 0,05	0,29 ± 0,05	0,07 ± 0,01
ND	0,27 ± 0,06	0,23 ± 0,09	0,05 ± 0,01
<i>Pele da pata</i>			
Naive	0,54 ± 0,07	0,41 ± 0,11	0,13 ± 0,05
IR	2,43 ± 0,15 ***	1,50 ± 0,27 ***	0,94 ± 0,25 ***
NIR	1,68 ± 0,31	0,68 ± 0,28	1,00 ± 0,18
NIRN	2,49 ± 0,44	1,27 ± 0,32	1,22 ± 0,15
IRN	2,29 ± 0,22	1,20 ± 0,25	1,09 ± 0,12
IRRaso	2,08 ± 0,28	0,96 ± 0,20	1,13 ± 0,10
NA	0,46 ± 0,05	0,35 ± 0,07	0,11 ± 0,03
NAD	0,47 ± 0,09	0,40 ± 0,09	0,07 ± 0,02
ND	0,47 ± 0,06	0,36 ± 0,07	0,05 ± 0,02

Os dados apresentados representam a média ± EPM de sete animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA da uma via seguida de Newman-Keuls.

*** $p < 0,001$ comparados ao Naive

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui demonstram, pela primeira vez, a caracterização bioquímica, farmacológica e comportamental de um modelo animal de DPIC, realizado em camundongos, que apresenta as características da síndrome da dor complexa regional tipo I humana. Além disso, foi observado que o exercício prolongado de alta intensidade (domínio severo) diminui a hipersensibilidade dolorosa presente neste modelo. Os achados mais relevantes do presente trabalho foram que, (1) a lesão isquêmica não altera a morfologia do nervo, comprovando que o modelo mimetiza a SDCR tipo I e não a tipo II; (2) a IR induz, na fase inicial, edema e hiperemia na pata do camundongo; (3) a IR leva a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio (10°C) na pata do primeiro dia a quarta semana após a lesão; (4) o tratamento sistêmico dos animais com o antioxidante NAC, diminui a hipersensibilidade mecânica gerada pela IR no segundo e sétimo dias após IR; (5) o tratamento sistêmico com ibuprofeno ou dexametasona diminui a hipersensibilidade mecânica gerada pelo modelo no segundo dia após IR, mas não no sétimo; (6) o tratamento sistêmico com morfina ou gabapentina diminui a hipersensibilidade mecânica no segundo e sétimo dias após IR; (7) seis dias após a lesão por IR da pata dos camundongos, ocorreu aumento dos níveis de tióis proteicos, não proteicos e totais na medula espinal e na pele da pata dos animais; (8) seis dias após a lesão por IR da pata, tanto na medula espinal quanto na pele da superfície plantar da pata, os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α se encontram inalterados quando comparados aos animais naive; (9) a natação aumenta a hiperemia da pata e diminui o edema, a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio de camundongos IR; (10) a natação não altera os níveis de tióis dos camundongos submetidos a DPIC.

Coderre e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo em ratos com sintomas comparáveis aos descritos em humanos com SDCR tipo I (GROENEWEG et al., 2009) que tornou possível estudar os mecanismos patofisiológicos da SDCR. Recentemente, Millecamps e colaboradores (2010) realizaram um estudo com o mesmo modelo em camundongos. Contudo, este estudo utilizou como base a caracterização feita em ratos. Outro grupo tentou desenvolver um modelo após fratura do osso tibial de rato e encontrou resultados importantes, mas o período de imobilização prolongado se tornou um problema para transpor o modelo para a clínica já que, na maior parte dos pacientes com SDCR, a imobilização agrava os sintomas (GUO et al., 2004).

Ludwig e colaboradores (2007) elaboraram outro modelo animal em que foi realizada a ligadura da artéria femoral por 3 horas e posterior reperfusão. Entretanto, os autores não encontraram mudanças sensoriais claras após a IR. A principal diferença entre o modelo animal do grupo do Coderre e o modelo do grupo do Ludwig é que, a ligadura da artéria femoral reduz o fluxo sanguíneo para a pata a quase zero, mas as veias são poupadas o que não ocorre no torniquete da pata. Isto faz com que o modelo do Coderre e colaboradores (2004) se torne mais próximo do que ocorre na clínica, uma vez que a SDCR ocorre geralmente após um trauma, em que veias e artérias são atingidas da mesma forma.

Um achado interessante mostrado no presente estudo foi que os camundongos submetidos a IR não apresentaram indicações de lesão do nervo tibial sob análise do microscópio óptico, o que demonstrou que o torniquete do tornozelo produziu um modelo de SDCR tipo I, mas não tipo II. Em animais, o modelo que é denominado dor pós-isquemia crônica (DPIC) apresentou o desenvolvimento de edema e hiperemia da pata, seguido de hipersensibilidade a estímulo mecânico e frio. No fim da primeira semana após a lesão os animais não apresentavam mais edema ou hiperemia, mas a hipersensibilidade persistiu por quatro semanas. Para a Associação Internacional para o Estudo da Dor (International Association for Study of Pain - IASP), em humanos a SDCR tipo I é uma síndrome que se desenvolve após um evento nocivo e deve seguir uma progressão temporal dos sintomas, resultando em três estágios distintos:

1. Hiperemia e edema;
2. Frio, hiperidrose e cianose;
3. Distonia e mudanças distróficas.

Esta progressão temporal não está presente em todos os pacientes, mas a maior parte deles sofre com uma dor espontânea intensa em queimação na parte distal do membro afetado (GROENEWEG et al., 2009; STANTON-HICKS et al., 1998). Além disso, a dor pode ser agravada pelo ortostatismo e pelo toque ou, se não for espontânea, pode ser evocada por estímulo mecânico ou térmico (STANTON-HICKS et al., 1998). Acredita-se que em pacientes com SDCR tipo I, é a lesão tecidual profunda que leva ao desenvolvimento de algo semelhante a síndrome compartimental (CODERRE; BENNETT, 2010). A síndrome compartimental ocorre após uma lesão tecidual que compromete a homeostasia de um compartimento (conjunto de tecidos moles envolvidos por uma fásia), levando ao aumento da pressão e diminuição do fluxo sanguíneo com conseqüente hipóxia e até necrose no local. As possíveis causas da síndrome

compartimental se resumem a fatores que aumentam o volume do compartimento (como o edema), diminuem o volume da fáscia (como uma queimadura) e distúrbios metabólicos que possam lesionar a microvasculatura (como a diabetes) (SHADGAN et al., 2010).

Uma hipótese para explicar este quadro foi proposta a partir do modelo de DPIC em que os ratos apresentaram vasoespasmos arteriais e uma lentidão ou até mesmo a ausência da reperfusão na microvasculatura dos tecidos profundos, fenômeno chamado de *slow flow/no-reflow*. Este fenômeno produz isquemia persistente que leva a um processo inflamatório persistente. Nos músculos e nos ossos, a inflamação e a isquemia (incluindo a geração de lactato) ativa e sensibiliza os nociceptores. Nos nervos, elas causam descargas ectópicas nos nociceptores (LAFERRIÈRE et al., 2008; CODERRE; BENNETT, 2010). Também há evidências de que a SDCR tipo I é acompanhada por mudanças em regiões do sistema nervoso central que regulam dor e sensações somáticas como os córtices sensorial primário e secundário, da ínsula, somatossensorial associativo, frontal e partes do córtex cingulado anterior. Essas evidências mostram que a percepção da dor deve ser diferente em indivíduos saudáveis e com SDCR tanto para dor evocada por estímulo térmico quanto para dor evocada por estímulo mecânico (MAIHÖFNER et al., 2005).

Ainda em humanos, são encontradas mudanças nas respostas vasculares, mas apenas localmente, no lado afetado pela SDCR (GROENEWEG et al., 2009). É possível que na fase aguda da SDCR ocorra uma inibição central dos neurônios vasoconstritores simpáticos, o que pode levar ao aumento da temperatura do membro afetado. As mudanças secundárias na transmissão neurovascular aliadas ao dano endotelial induzem vasoconstrição e pele fria em pacientes com um quadro crônico de SDCR (BARON, 2009). O fato de que no presente estudo os camundongos submetidos a IR apresentaram hiperemia, mas não uma diminuição na temperatura pode refletir no período relativamente curto de observação do animal. Entretanto, é importante salientar que experimentos adicionais devem ser realizados para que se tenha certeza se a diminuição da temperatura ocorre mesmo ou não.

Além disso, o presente estudo demonstrou que o tratamento sistêmico de camundongos com analgésicos (ibuprofeno e dexametasona) já utilizados na prática clínica para o tratamento da síndrome, reduziu a hipersensibilidade mecânica no segundo dia após a IR, mas não no sétimo dia. Corroborando com estes dados, ratos que receberam tratamento sistêmico com analgésicos (acetaminofeno, ibuprofeno e dexametasona) no mesmo período, apresentaram

diminuição da hipersensibilidade mecânica apenas quando tratados com dexametasona dois dias após IR. No entanto, nenhum dos analgésicos apresentou efeito anti-hipernociceptivo em ratos no sétimo dia. Clinicamente, o alívio da dor presente na SDCR está longe de ser satisfatório, mas os analgésicos são utilizados como adjuntos a outras terapias (MILLECAMPS; CODERRE, 2008).

O presente estudo também analisou o efeito de tratamentos sistêmicos com anti-neuropáticos, como morfina e gabapentina. Assim, pode-se observar que o efeito destes fármacos foram superiores quando comparados com o tratamento realizado com os analgésicos anti-inflamatórios tanto no segundo quanto no sétimo dia após IR. Quando se fala de morfina, ou de opióides de modo geral, sabe-se há muito tempo que o seu uso na prática clínica é controverso. Apesar de serem considerados pouco efetivos no tratamento da dor neuropática, alguns estudos clínicos demonstram que eles podem ser extremamente úteis em determinados casos (STANTON-HICKS et al., 1998). Em ratos, o tratamento com morfina causou um efeito anti-hipernociceptivo significativo, apesar de pequeno no segundo dia após IR. No sétimo dia, não houve diferença entre o grupo tratado e o não tratado. Já o tratamento com pregabalina (um análogo da gabapentina) foi efetivo tanto no segundo quanto no sétimo dia após a IR. Além disso, a gabapentina tem se mostrado efetiva reduzindo nocicepção inflamatória, isquêmica e neuropática em diversos modelos animais (MILLECAMPS; CODERRE, 2008) e existem evidências de que há alguma eficácia no tratamento da dor de pacientes com SDCR (STANTON-HICKS et al., 1998). Sendo assim, a gabapentina pode ser considerada como um potencial tratamento da dor na SDCR tipo I.

No presente estudo foi também observado que o tratamento sistêmico com o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) atenuou a hipersensibilidade mecânica em camundongos dois e sete dias após IR. Dados da literatura demonstram que em ratos com DPIC, o antioxidante NAC também reduz a hipersensibilidade mecânica (CODERRE et al., 2004). Corroborando com estes dados, neste estudo foi demonstrado que a IR em camundongos induz níveis elevados de tióis tanto na pele da superfície plantar da pata quanto na medula espinal. Já é bem conhecido que tióis são compostos contendo grupos SH que, em proteínas, podem funcionar como estrutura ou centros regulatórios. Em substâncias não proteicas, tióis como a glutatona tem um papel importante nas defesas antioxidantes da célula (ROSSATO et al., 2010; MORAN et al., 2003). Assim, os níveis elevados de tióis muito provavelmente representam uma resposta compensatória ao estresse oxidativo (CODERRE;

BENNETT, 2008). Além disso, já foi demonstrado que um dos produtos da peroxidação lipídica induzida por radicais livres, o malondialdeído, se encontra significativamente elevado no músculo da pata de ratos com DPIC (CODERRE; BENNETT, 2010). O nível de lactato encontra-se também aumentado no músculo da pata de ratos com DPIC (LAFERRIÈRE et al., 2008) e na pele de membros afetados de humanos com SDCR-I, sugerindo que há um aumento da glicólise anaeróbica (BIRKLEIN; WEBER; NEUNDORFER, 2000). É bem aceito que durante a isquemia, a mitocôndria não funciona bem e que há uma sequência de redução do oxigênio que origina produtos intermediários reativos. A concentração destes produtos reativos é limitada em tecidos não isquêmicos pela existência de um delicado balanço entre a geração de diversos agentes oxidantes e do mecanismo de defesa antioxidante (FERRARI et al., 1991). Estes achados prévios da literatura em associação com os resultados presentes neste estudo sugerem papel chave dos radicais livres como causa do dano observado nas vênulas e nos capilares de animais DPIC. Entretanto ainda são necessários estudos adicionais para que se possa afirmar isso com propriedade.

Também foi observado no presente trabalho que seis dias após DPIC em camundongos, não houve mudança nos níveis de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) ou interleucina-10 (IL-10) nem na pele da pata, nem na medula espinal. Desta forma, as citocinas inflamatórias devem ter uma função crítica na indução da hipersensibilidade em camundongos DPIC, mas não na sua manutenção. Além de causar dor, as células epiteliais dos capilares são estimuladas a liberar diversos mediadores pró-inflamatórios. E os radicais livres aumentam a expressão de moléculas que são quimiotáticas e recrutam monócitos, leucócitos e plaquetas que se acumulam e ocluem o lúmen do capilar e liberam TNF- α , IL-1 e IL-6, produzindo efeitos tóxicos que provavelmente atingem também os tecidos adjacentes. Além disso, TNF- α , IL-1, IL-6 e fator nuclear kappa B (NF κ B) foram medidos entre cinco minutos e dois dias após IR e apresentaram níveis elevados na pata de ratos DPIC (LAFERRIÈRE et al., 2008). Desta forma, sugere-se que uma geração de citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF κ B deve ser importante na indução da DPIC (CODERRE; BENNETT, 2010). Clinicamente, um dado interessante é o que se apresenta no estudo de Huygen e colaboradores (2002) que comparou níveis de TNF- α e IL-6 e achou indicativo de inflamação apenas no plasma de pacientes com SDCR em estágio agudo. Outro estudo clínico com pacientes com SDCR em estágio

crônico analisou líquido subcutâneo retirado por sucção de uma bolha implantada artificialmente e mostrou que não há diferenças nos níveis de TNF- α e IL-6, apesar de que alguns pacientes ainda apresentavam sinais de inflamação (WESSELDIJK et al., 2008a). Assim, não foi observada uma relação direta entre as citocinas pró-inflamatórias e as características da doença como dor, mudanças de temperatura, volume e mobilidade do membro afetado e nem mesmo da duração da doença (WESSELDIJK et al., 2008a; WESSELDIJK et al., 2008b).

Na segunda fase deste trabalho, foi observado que a natação altera o perfil de edema e hiperemia da pata de camundongos DPIC. Os grupos exercitados (NIR, NIRN e IRN) e o IRRaso apresentaram piora no quadro de hiperemia, com aumento da diferença de temperatura entre as patas. Entretanto, quando se analisou o edema, houve melhora: os grupos IRN e IRRaso apresentaram diminuição da diferença da espessura das patas em relação ao grupo IR. A DPIC em ratos é induzida após a oclusão completa do fluxo sanguíneo para a pata por três horas e leva a anomalias vasculares que são semelhantes as dos humanos com SDCR, como vasoespasmos arteriais e *slow flow/no reflow* em capilares. Os vasoespasmos ocorrem devido a redução na vasodilatação induzida pelo óxido nítrico e hiperresponsividade das células musculares lisas arteriais a norepinefrina. *Slow flow/no-reflow* é um fenômeno que ocorre com o dano que leva ao edema das células endoteliais dos capilares e como consequência, as plaquetas e os glóbulos brancos obstruem o capilar, bloqueando a passagem dos glóbulos vermelhos (LAFERRIÈRE et al., 2008).

Por outro lado, é conhecido que ocorre hiperemia reativa passageira a reperfusão devido ao estresse de cisalhamento, ou seja, a força que o retorno do fluxo sanguíneo faz de forma paralela ao vaso. Já o exercício leva a um aumento sustentado do estresse de cisalhamento e depende também da intensidade de contração dos vasos pela musculatura adjacente (PYKE; JAZULI, 2010). Além disso, ocorre a chamada hiperemia ativa que é devida ao aumento do metabolismo com consequente vasodilatação (GUYTON; HALL, 2006). Entretanto, estudo recente com exercício de musculação em humanos mostrou que não há relação clara entre este aumento no estresse de cisalhamento e a diminuição da hiperemia reativa que ocorreu nos sujeitos estudados (PYKE; JAZULI, 2010). Além disso, existe uma teoria de que o exercício regula a angiogênese vascular encefálica através do fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor* - VEGF) o qual aumenta a quantidade de vasos no local, levando a tolerância a isquemia (ZHANG; WU; JIA, 2011). É possível que o

exercício físico cause angiogênese também na pata do camundongo, diminuindo assim os efeitos de vasoespasmos e *slow flow/no reflow* causados pela DPIC e assim, alterando o perfil de edema e hiperemia. Entretanto não há correlação clara entre a diminuição do edema e a maior densidade vascular (KORPISALO et al., 2010) e é necessário que se façam estudos adicionais do comportamento vascular frente ao exercício para determinar se a angiogênese ocorre mesmo ou não e como isto influencia na hiperemia e no edema induzidos no modelo de DPIC.

Outro aspecto observado nesta fase do trabalho foi que o protocolo de natação diminui a hipersensibilidade mecânica de camundongos DPIC, seja ele realizado somente antes, somente após, ou antes e após a IR. Já a hipersensibilidade térmica é diminuída de forma significativa apenas com o exercício mais prolongado, realizado antes e após a IR. Corroborando com estes dados, crianças que realizaram tratamento com exercício (hidroterapia) tiveram quase 97% de remissão da SDCR (STANTON-HICKS, 2010). Além disso, a diminuição da hipersensibilidade ocorreu apesar do protocolo estendido de exercício, realizado neste estudo, provocar um aumento no nível de lactato (MAZZARDO-MARTINS, 2010). Contrapondo este dado, Laferrière e colaboradores (2008) demonstraram que o exercício agudo (uma sessão de corrida em esteira circular) aumenta o nível de lactato e a hipersensibilidade mecânica induzida por DPIC em ratos. Desta forma, sugere-se que, da mesma forma que o aumento no nível de lactato após a isquemia altera a percepção da dor, o aumento de lactato após o protocolo estendido de natação diminui a hipersensibilidade. Além disso, sabe-se que o protocolo estendido realizado neste estudo diminui a hipersensibilidade química através da ativação de receptores opióides e que opióides endógenos liberados das glândulas adrenais bem como o sistema serotoninérgico também estão envolvidos nesta diminuição de hipersensibilidade (MAZZARDO-MARTINS, 2010). No entanto, são necessários estudos adicionais que relacionem o protocolo estendido de exercício com DPIC para que se possa afirmar o mecanismo pelo qual ocorre a diminuição da hipersensibilidade.

Por fim, neste estudo foi observado que o exercício de alta intensidade (natação) não altera os níveis de tióis dos camundongos DPIC. Já é bem conhecido que o exercício produz estresse oxidativo, aumentando a geração de radicais livres de diversas formas. Dois a 5% do oxigênio utilizado pela mitocôndria forma radicais livres. Como a fosforilação oxidativa aumenta em resposta ao exercício, há aumento na produção de radicais livres (URSO; CLARKSON, 2003). Em resposta,

seria esperado aumento nas defesas antioxidantes e, portanto, nos níveis de tióis. Entretanto os níveis de tióis não diferem entre animais exercitados e não exercitados. Para afirmar se realmente não há aumento das defesas antioxidantes devido ao exercício, são necessários estudos adicionais.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- 1) No que se refere à caracterização do modelo de dor pós isquemia crônica (DPIC):
 - a) O modelo de DPIC aqui padronizado representa a SDCR tipo I e não tipo II; tendo em vista que não foi observado alteração morfológica do nervo tibial anterior quando analisado sob microscópio óptico;
 - b) Observou-se hiperemia, edema, hipersensibilidade ao frio e mecânica, sinais e sintomas presentes na SDCR tipo I. Acredita-se que isto ocorra devido a alteração da microvasculatura local, com a diminuição do fluxo sanguíneo (podendo chegar a interrupção do fluxo) causando lesão permanente nos tecidos adjacentes;
 - c) A hipersensibilidade mecânica foi revertida por anti-inflamatórios (ibuprofeno e dexametasona) agudamente (no segundo dia após IR) e por anti-neuropáticos (morfina e gabapentina) aguda e cronicamente (no segundo e sétimo dia após IR). Estes resultados sugerem que a dor da SDCR tipo I é refratária a maior parte dos tratamentos analgésicos utilizados atualmente;
 - d) O antioxidante NAC atenuou a hipersensibilidade mecânica aguda e cronicamente (no segundo e sétimo dia após IR). Além disso, foram observados níveis elevados de tióis no sexto dia após a IR. Estes dados sugerem que o estresse oxidativo está envolvido na indução e na manutenção da hipersensibilidade mecânica observada na DPIC;
 - e) Os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias não se encontraram alterados cronicamente (sexto dia após IR). A literatura, entretanto, revela que na fase aguda (por volta do segundo dia) da hipersensibilidade, há um aumento nos níveis de citocinas. Estes dados sugerem que as citocinas inflamatórias devem ter uma função importante na indução, mas não na manutenção da hipersensibilidade.
- 2) No que se refere aos efeitos da natação sobre a DPIC:
 - a) O exercício alterou o perfil de hiperemia e de edema induzido pela DPIC, aumentando a hiperemia e diminuindo o edema. Desta forma, percebeu-se a possibilidade de alteração vascular

também pelo exercício através de angiogênese que minimizaria os efeitos dos danos vasculares causados pela IR;

- b) O exercício foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio. Acredita-se que esta redução seja devida ao aumento no nível de lactato após o protocolo estendido de natação que diminui a hipersensibilidade da mesma forma que altera a percepção da dor após isquemia.
- c) A natação não altera os níveis de tióis na medula espinal e pele da pata dos camundongos DPIC. Para verificar se o exercício físico promove ou não um aumento nas defesas oxidantes, são necessários estudos adicionais que demonstrem de forma clínica e pré-clínica se é o estresse oxidativo da IR que causa o dano celular na SDCR tipo I e de que forma o exercício atua nesta lesão. Além disso, é preciso analisar de que forma a IR afeta a função mitocondrial dos camundongos e o efeito do exercício físico sobre a mesma.

Portanto, estes dados confirmam que a IR da pata pode ser utilizada como modelo animal da SDCR tipo I e que o exercício físico pode contribuir de forma terapêutica para reduzir os sinais e sintomas desta síndrome.

REFERÊNCIAS

AGUIAR JR, A. S.; BOEMER, G.; RIAL, D.; CORDOVA, F. M.; MANCINI, G.; WALZ, R.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; LEAL, R. B.; PINHO, R. A.; PREDIGER, R. D. S. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory In mice: involvement of the striatal glutathione Antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience**, v. 171, p. 1216-1227. 2010.

AND, R. D. S.; PREDIGERASCHNER, M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. **Toxicological Letters**, v. 102-102, p. 283-287. 1998.

BAPTISTA, A. F.; GOMES, J. R. D. S.; OLIVEIRA, J. T.; SANTOS, S. M. G.; VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINEZ, A. M. B. A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse- Adaptation of the sciatic static index. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 161, n. 2, p. 259-264. 2007.

BARON, R. Complex Regional Pain Syndrome (CRPS). **European Journal of Pain**, v. 13, p. S3. 2009.

BECKER, B. E.; COLE, A. J. Aquatic rehabilitation. In: **Rehabilitation medicine: principles and practice**. DeLisa, J. A.; Gans, B. M. eds. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 887-901. 1998.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107. 1988.

BIRKLEIN, F.; WEBER, M.; NEUNDORFER, B. Increased skin lactate in complex regional pain syndrome: Evidence for tissue hypoxia? **Neurology**, v. 55, p. 1213-1215. 2000.

BOOTH, F. W. Waging war on physical inactivity: Using modern molecular ammunition against an ancient enemy. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 1, p. 3-30. 2002.

BOOTH, M. L.; BAUMAN, A.; OWEN, N.; GORE, C. J. Physical activity preferences, preferred sources of assistance, and perceived barriers to increased activity among physically inactive Australians. **Preventive Medicine**, v. 26, n. 1, p. 131-137. 1997.

CARGNIN-FERREIRA, E.; SARASQUETE, C. **Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos**. Madrid: CSIC. 2008.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Reports**, v. 100, n. 2, p. 126-131. 1985.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55-63. 1994.

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. A Hypothesis for the Cause of Complex Regional Pain Syndrome-Type I (Reflex Sympathetic Dystrophy): Pain Due to Deep-Tissue Microvascular Pathology. **Pain Medicine**, v. 11, p. 1224-1238. 2010.

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. Editorial: Objectifying CRPS-I. **Pain**, v. 138, p. 3-4. 2008.

CODERRE, T. J.; XANTHOS, D. N.; FRANCIS, L.; BENNETT, G. J. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, v. 112, p. 94-105. 2004.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, L. A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 9, p. 467-472. 2007.

DE KEYSER, J.; SULTER, G.; LUITEN, P. G. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? **Trends in Neurosciences**, v. 22, p. 535-540, 1999.

DE MOS, M.; DE BRUIJN, A. G.; HUYGEN, F. J.; DIELEMAN, J. P.; STRICKER, B. H.; STURKENBOOM, M. C. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. **Pain**, v. 129, p. 12-20. 2007.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, p. 391-397, 1999.

DISHMAN, R. K.; BERTHOUD, H. R.; BOOTH, F. W.; COTMAN, C. W.; EDGERTON, V. R.; FLESHNER, M. R.; GANDEVIA, S. C.; GOMEZ-PINILLA, F.; GREENWOOD, B. N.; HILLMAN, C. H.; KRAMER, A. F.; LEVIN, B. E.; MORAN, T. H.; RUSSO-NEUSTADT, A. A.; SALAMONE, J. D.; VAN HOOMISSEN, J. D.; WADE, C. E.; YORK, D. A.; ZIGMOND, M. J. Neurobiology of exercise. **Obesity**, v. 14, n. 3, p. 345-356. 2006.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95. 2002.

DUGAN, L. L.; CHOI, D. W. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. **Annals of Neurology**, v. 35, p. S17-2. 1994.

FELIU, Miriam H.; EDWARDS, Christopher L. Psychologic Factors in the Development of Complex Regional Pain Syndrome: History, Myth, and Evidence. **The Clinical Journal of Pain**, v. 26, p. 258–263. 2010.

FERRARI, R.; CECONI, C.; CURELLO, S.; CARGNONI, A.; PASINI, E.; DE GIULI, F.; ALBERTIN, A. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 215S-222S. 1991.

FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R. J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dynamic Medicine**. v. 8, p. 1. 2009.

FOSS, M. L.; KETEYIAN, S. J. **Fox Bases Fisiológicas do Exercício e do Esporte**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

- FRANTSEVA, M. V.; CARLEN, P. I.; VELAZQUEZ, J. L. P. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. **Free radical biology & medicine**, v. 31, p. 1216-1227. 2001.
- GAESSER, G. A.; POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in human. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 24, n. 1, p. 35-70. 1996.
- GROENEWEG, G.; HUYGEN, F. J. P. M.; CODERRE, T. J.; ZIJLSTRA, F. J. Regulation of peripheral blood flow in Complex Regional Pain Syndrome: clinical implication for symptomatic relief and pain management. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 10, p. 116. 2009.
- GUO, T. Z.; OFFLEY, S. C.; BOYD, E. A.; JACOBS, C. R.; KINGERY, W. S. Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. **Pain**, v. 108, p. 95–107. 2004.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**, 11th. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.
- HUYGEN, F. J. P. M.; DE BRUIJN, A. G. J.; DE BRUIN, M. T.; GROENEWEG, G.; KLEIN, J.; ZIJLSTRA, F. J. Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1. **Mediators of Inflammation**, v. 11, p. 47-51. 2002.
- KORPISALO, P.; HYTÖNEN, J. P.; LAITINEN, J. T.; LAIDINEN, S.; PARVIAINEN, H.; KARVINEN, H.; SIPONEN, J.; MARJOMÄKI, V.; VAJANTO, I.; RISSANEN, T. T.; YLÄ-HERTTUALA, S. Capillary enlargement, not sprouting angiogenesis, determines beneficial therapeutic effects and side effects of angiogenic gene therapy. **European Heart Journal**, [Epub ahead of print]. 2010.
- KUPHAL, K. E.; FIBUCH, E. E.; TAYLOR, B. K. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 12, p. 989-897. 2007.

LAFERRIÈRE, A.; MILLECAMPS, M.; XANTHOS, D. N.; XIAO, W. H.; SIAU, C. DE MOS, M.; SACHOT, C.; RAGAVENDRAN, J. V.; HUYGEN, F. J. P. M.; BENNETT, G. J.; CODERRE, T. J. Cutaneous tactile allodynia associated with microvascular dysfunction in muscle. **Molecular Pain**, v. 4, p. 49-60. 2008

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3rd. ed. New York: Worth Publishers, 2000.

LUDWIG, J.; GORODETSKAYA, N.; SCHATTSCHEIDER, J.; JÄNIG, W.; BARON, R. Behavioral and sensory changes after direct ischemia-reperfusion injury in rats. **European Journal of Pain**, v. 11, p. 677-684. 2007.

MAIHÖFNER, C.; SEIFERT, F.; MARKOVIC, K. Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. **European Journal of Neurology**, [Epub ahead of print]. 2010.

MAIHÖFNER, C.; FORSTER, C.; BIRKLEINC, F.; NEUNDÖRFER, B.; HANDWERKER, H. O. Brain processing during mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: a functional MRI study. **Pain**, v. 114, p. 93-103. 2005.

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

MAZZARDO-MARTINS, L. **Exercício físico de alta intensidade induz hiponociceção visceral em camundongos**: evidência para o envolvimento de opióides endógenos e serotonina. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D. F.; MARCON, R.; DOS SANTOS, U. D.; SPECKHANN, B.; GADOTTI, V. M.; SIGWALT, A. R.; GUGLIELMO, L. G.; SOARES SANTOS, A. R. High-Intensity Extended Swimming Exercise Reduces Pain-Related Behavior in Mice: Involvement of Endogenous Opioids and the Serotonergic System. **Journal of Pain**, May 19. [Epub ahead of print]. 2010.

MILLECAMPS, M.; LAFERRIÈRE, A.; RAGAVENDRAN, J. V.; STONE, L. S.; CODERRE, T. J. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). **Pain**, v. 151, p. 174-183. 2010.

MILLECAMPS, M.; CODERRE, T. J. Rats with chronic post-ischemia pain exhibit an analgesic sensitivity profile similar to human patients with complex regional pain syndrome — type I. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, p. 97-102. 2008.

MITANI, A.; YANASE, H.; SAKAI, K.; WAKE, Y.; KATAOKA, K. Origin of intracellular Ca^{2+} elevation induced by *in vitro* ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Research**, v. 601, p. 103-110, 1993.

MORAN, L. K.; GUTTERIDGE, J. M.; QUINLAN, G. J. Thiols in cellular redox signalling and control. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 763-772. 2003.

PHILLIS, J. W.; O'REGAN, M. H.; ESTEVEZ, A. Y.; SONG, D.; VANDERHEIDE, S. J. Cerebral energy metabolism during severe ischemia of varying duration and following reperfusion. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, p. 1525-1531, 1996.

PITCHER, G.M.; HENRY, J.L. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. **Experimental Neurology**. v. 186, n. 2, p. 173-197. 2004.

PYKE, K. E.; JAZULI, F. Impact of repeated increases in shear stress via reactive hyperaemia and handgrip exercise: No evidence of systematic changes in brachial artery FMD. **American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology**, [Epub ahead of print]. 2010.

QUINTÃO, N.L.; BALZ, D.; SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 614-20. 2006.

REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO, J. L.; WILHELM FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 146, n. 1-2, p. 22-53. 2007.

ROSSATO, M. F.; VELLOSO, N. A.; FERREIRA, A. P. O.; DE MELLO, C. F.; FERREIRA, J. Spinal Levels of Non Protein Thiols Are Related to Nociception in Mice. **Journal of Pain**, v. 11, p. 545-554. 2010.

SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 24, p. 351-371. 2004.

SHADGAN, B.; MENON, M.; SANDERS, D.; BERRY, G.; MARTIN, C. JR., DUFFY, P.; STEPHEN, D.; O'BRIEN, P. J. Current thinking about acute compartment syndrome of the lower extremity. **Canadian Journal of Surgery**, v. 53, n. 5, p. 329-334. 2010.

SPIELMAN, F. J.; GHIA, J. N.; TEEPLE, E.; MANDELL, V. S. Ulnar Artery Occlusion Simulating Reflex Sympathetic Dystrophy. **Anesthesiology**, v. 54, p. 343-345. 1981.

STANTON-HICKS, M. Plasticity of complex regional pain syndrome (CRPS) in children. **Pain Medicine**, v. 11, p. 1216-1223. 2010.

STANTON-HICKS, M.; BARON, R.; BOAS, R.; GORDH, T.; HARDEN, N.; HENDLER, N.; KOLTZENBURG, M.; RAJ, P.; WILDER, R. Complex Regional Pain Syndromes: Guidelines for Therapy. **The Clinical Journal of Pain**, v. 14, n. 2, p. 155-166. 1998.

TANAKA, H. Swimming exercise. **Sports Medicine**, v. 39, n. 5, p. 377-387. 2009.

TAYLOR, D.; OBRENOVITCH, T. P.; SYMON, L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neurochemical research**, v. 21, n. 9, p. 1013-1021, 1996.

UEMATSU, S.; EDWIN, D. H.; JANKEL, W. R.; KOZIKOWSKI, J.; TRATTNER, M. Quantification of thermal asymmetry. Part 1: Normal values and reproducibility. **J Neurosurg**, v. 69, p. 552-555. 1988.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54. 2003.

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

VELDMAN, P. H.; REYEN, H. M.; ARNT, I. E.; GORIS, R. J. Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: Prospective study of 829 patients. **Lancet**, v. 342, p. 1012-1016. 1993.

WESSELDIJK, F.; HUYGEN, F. J.; HEIJMANS-ANTONISSEN, C.; NIEHOF, S. P.; ZIJLSTRA, F. J. Six years follow-up of the levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with complex regional pain syndrome type 1. **Mediators of Inflammation**, v. 46, p. 943-949. 2008a.

WESSELDIJK, F.; HUYGEN, F. J.; HEIJMANS-ANTONISSEN, C.; NIEHOF, S. P.; ZIJLSTRA, F. J. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6 are not correlated with the characteristics of Complex Regional Pain Syndrome type 1 in 66 patients. **European Journal of Pain**. v. 12, p. 716-721. 2008b.

ZEMKE, D.; SMITH, J. L.; REEVES, M. J.; MAJID, A. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 6, p. 895-904. 2004.

ZHANG, F.; WU, Y.; JIA, J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. **Neuroscience**, [Epub ahead of print]. 2011.

ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110. 1983.